

BIOTECHNOLOGISCHE HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER HUMANEN MASTZELL-TRYPTASE γ

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Maria Theresa Grundhuber

München, 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Sondergutachter: Prof. Dr. Christian P. Sommerhoff

Tag der Abgabe: 07.09.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

München, den 27.01.2017

.....
(Unterschrift)

Maria Theresa Grundhuber

Erklärung

Hiermit erkläre ich, *

- ☐ dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- ☐ dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
- ☐ ~~dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach~~
~~und in den Nebenfächern~~
~~bei der Fakultät für der~~
~~unterzogen habe.~~ (Hochschule/Universität)
- ☐ ~~dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.~~

München, den

.....
(Unterschrift)

*) Nichtzutreffendes streichen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2010 bis Januar 2016 in der
Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik
(Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum)
und im
Institut für Laboratoriumsmedizin (Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser),
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	11
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Zusammenfassung	15
2 Summary	17
3 Einleitung	19
3.1 Die humane Mastzelle	19
3.2 Die Tryptase-Familie	21
3.2.1 Die Gene <i>TPSAB1</i> und <i>TPSB2</i>	21
3.2.2 Tryptase β	22
3.2.3 Tryptase α	25
3.2.4 Tryptase δ	27
3.2.5 Tryptase γ	28
3.3 Aufgabenstellung	29
4 Materialien und Methoden	31
4.1 Materialien	31
4.1.1 Geräte	31
4.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Materialien	32
4.1.3 Materialien und Reagenzien für mikro- und molekularbiologische Arbeiten	32
4.1.4 Materialien und Reagenzien für proteinchemische Arbeiten	33
4.1.5 Reagenzien für enzymkinetische Methoden	34
4.1.6 Antikörper.....	34
4.1.7 ELISA-Kits.....	35
4.1.8 Pufferlösungen und Medien	35
4.1.9 Bakterien- und Hefestämme	37
4.1.10 Plasmide	37
4.1.11 Konstrukte	38
4.1.12 Primer	38
4.1.13 Software-Programme und Datenbanken	39
4.2 Methoden	40
4.2.1 Molekularbiologische Methoden	40
4.2.2 Mikrobiologische Methoden	43
4.2.3 Rekombinante Expression der Tryptase γ -Formen in <i>P. pastoris</i>	46
4.2.4 Chromatographische Methoden.....	48

4.2.5	Proteinchemische Methoden	50
4.2.6	Enzymkinetische Methoden	55
4.2.7	Immunbiologische Methoden	63
4.2.8	Bioinformatik	68
5	Ergebnisse	69
5.1	Evaluierung von Expressionskonstrukten für die Herstellung von Tryptase γ in <i>Pichia pastoris</i>	69
5.2	Rekombinante Expression der katalytischen Domäne	71
5.2.1	Herstellung von Cysteinvarianten	71
5.2.2	Wahl des Expressionssystems	76
5.2.3	Expression in verschiedenen Wirtsstämmen	78
5.2.4	Optimierung und 'Upscaling'	80
5.2.5	Isolierung und proteinchemische Charakterisierung der rhTryptase γ	84
5.3	Rekombinante Herstellung des Tryptase γ -Zymogens	92
5.3.1	Expression im Minimal- und Vollmedium	92
5.3.2	Rekombinante Expression des Tryptase γ -Zymogens im Bioreaktor	93
5.3.3	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose	94
5.3.4	Prozessierung des Tryptase γ -Zymogens mit Trypsin	96
5.4	Rekombinante Expression einer enzymatisch inaktiven Tryptase γ -Variante	100
5.4.1	Herstellung des Expressionsplasmids	100
5.4.2	Rekombinante Expression der S222A-rhTryptase γ	100
5.5	Funktionelle Charakterisierung der Tryptase γ	102
5.5.1	Prozessierung des Zymogens	102
5.5.2	Prozessierung der C-terminalen Domäne	104
5.5.3	Analyse der Quartärstruktur mittels Gelfiltration	106
5.5.4	Bestimmung der Affinität zu Heparin	107
5.5.5	Analyse des pH-Optimums	108
5.5.6	Substratspezifität	110
5.5.7	Prozessierung (patho)physiologisch relevanter Substrate	113
5.5.8	Hemmkinetische Charakterisierung	120
5.6	Herstellung spezifischer rhTryptase γ -Substrate	126
5.6.1	Analyse der Substratspezifität mit <i>Hybrid Combinatorial Substrate Libraries</i> ...	126
5.6.2	Synthese und Charakterisierung von rhTryptase γ -Substraten	131
5.7	Herstellung spezifischer anti-rhTryptase γ Antikörper	134
5.7.1	Charakterisierung von anti-Tryptase-Antikörpern	134
5.7.2	Herstellung eines polyklonalen anti-Tryptase γ -Antikörpers	136
5.8	Entwicklung eines Sandwich ELISA für rhTryptase γ	139

5.8.1	Auswahl der ELISA-Antikörper	139
5.8.2	Optimierung des rhTryptase γ -ELISAs	139
5.8.3	Validierung des Sandwich-ELISAs zur Quantifizierung von Tryptase γ	141
6	Diskussion	145
6.1	Rekombinante Expression der katalytischen Domäne der Tryptase γ	145
6.1.1	Rekombinante Expression in <i>E. coli</i>	145
6.1.2	Expression der wt-Form in <i>Pichia pastoris</i>	146
6.1.3	Optimierung der Expression und präparative Herstellung	149
6.1.4	Isolierung der rhTryptase γ	150
6.1.5	Proteinchemische Charakterisierung der rhTryptase γ	151
6.2	Rekombinante Expression des Tryptase γ -Zymogens	152
6.3	Regulationsmechanismen der rhTryptase γ	155
6.3.1	Prozessierung des Zymogens	155
6.3.2	Abspaltung der Ektodomäne und Aktivität im Extrazellulärraum	157
6.3.3	Substratspezifität der rhTryptase γ	158
6.3.4	Strukturelle Untersuchungen der rhTryptase γ	159
6.4	Entwicklung von Assays für rhTryptase γ	161
6.4.1	Synthese spezifischer Substrate zur Detektion der rhTryptase γ	161
6.4.2	Identifizierung von Inhibitoren der rhTryptase γ	162
6.4.3	Charakterisierung von Antikörpern und ELISAs	163
6.4.4	Generierung von anti-Tryptase γ -Antikörper und eines Sandwich-ELISAs	165
7	Ausblick	167
8	Literaturverzeichnis	169
9	Anhang	179
9.1	Lebenslauf	179
9.2	Aufstellung natürlich und nicht natürlich vorkommender Aminosäuren	182

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich bei der Erstellung der Doktorarbeit unterstützt haben.

Außerordentlich dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Heinrich Leonhardt für die Betreuung an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Sommerhoff für die hervorragende Betreuung der Arbeit. Seine Anregungen, Ratschläge und konstruktive Kritik waren eine große Unterstützung und prägten wesentlich meine wissenschaftliche Herangehensweise. Außerdem möchte ich mich für die zahlreichen Gelegenheiten, an nationalen und internationalen Konferenzen teilnehmen zu können, bedanken.

Frau Prof. Dr. Marianne Jochum, Leiterin der ehemaligen Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, und Herrn Prof. Dr. Daniel Teupser, Leiter des Instituts für Laboratoriumsmedizin am Klinikum der LMU, danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes.

Für die finanzielle Förderung des Projekts möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken (SPP 1394).

Herrn Prof. Dr. Norbert Schaschke, Hochschule Aalen, danke ich herzlich für die Kooperation und Bereitstellung von Inhibitoren und Substraten und die fachliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt den Kooperationspartnern Prof. Dr. Marcin Drag und Dr. Marcin Poreba, Universität Wroclaw, Polen, die mir die Substratbibliotheken zur Verfügung gestellt, die spezifischen Substrate hergestellt und mich bei einem einwöchigen Aufenthalt in Breslau sehr freundlich aufgenommen haben.

Den Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried, Herrn Reinhardt Mentele und Frau Elisabeth Weyher-Stingl, danke ich herzlich für die Durchführung der Aminosäuresequenzierungen und für die Hilfe bei der CD-Spektroskopie.

Für die technische und fachliche Unterstützung danke ich im besonderen Sabine Streicher, Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger, Erika Falk, Annemarie Oettl und Lhoucine Ait-Hammou. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Stefan Simon für die Einführung und die außerordentlich gute Zusammenarbeit am Bioreaktor „Ricky Rocket“.

Die freundliche und wissenschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors wurde außerdem durch Frank Brennfleck, Tobias Schmidt, Florence Bieringer, Luisa-Astrid Fratila, Denise Birk, Julia Leding, Alina Kappenberger, Karina Suchowski und Dr. Beatrice Bachmeier bestimmt; ihnen möchte ich ganz besonders danken.

Frau Karola Rügamer-Biese, Frau Evelyn Themel und Frau Anne Köppel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre freundliche Unterstützung bei bürokratischen Fragen.

Für das familiäre und wissenschaftliche Arbeitsklima, das durch fachliche Diskussionen, einer großen Hilfsbereitschaft und viel Freude im Arbeitsalltag geprägt war, danke ich Dr. Jasmin Leschner, Dr. Jens Feierler, Dr. Steffen Kraus, Steffen Schüssler, Martina Rami, Prof. Dr. Alexander Faußner, Cornelia Seidl, Dr. Peter Neth, Dr. Tanja Popp, Dr. Virginia Egea, Prof. Dr. Sabine Steffens, Dr. Dorit Nägler und Thomas Pitsch. Insbesondere die große Kollegialität nach der Abteilungsauflösung verdient gesonderten Dank.

Besonders danke ich Dr. Larisa Ring, die mir als Kollegin mit ihrer großen Diskussionsfreude über praktische und theoretische Fragen und als Freundin eine große Unterstützung war und die Zeit sehr bereichert hat.

Schließlich möchte ich meiner Familie, Elisabeth, Hans, Lena Grundhuber und Jakob Anthoff für ihre große moralische Unterstützung während der Erstellung der Arbeit danken.

Abkürzungsverzeichnis

A	Auftrag
Abs.	Absorption
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACC	7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AOX	Alkoholoxidase
APC	N-(1-Hydroxy-2-naphthoyl)-L-arginyl-L-prolinamide
APPA	4-Amidinophenylbrenztraubensäure
ARG	Argininosuccinat Lyase Gen
ATIII	Antithrombin III
BMG	Buffered Glycerol-minmal Medium
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMM	Buffered Methanol minimal Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
bz	Schutzgruppe Benzoyl
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CV	Säulenvolumen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DL	Durchlauf
E	Elutionsfraktion
E64	L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butan
Endkonz.	Endkonzentration
Endo H _f	Endoglykosidase
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
His ⁻	Histidinol dehydrogenase defizient
His ⁺	Histidinol dehydrogenase plus
His ₆	Hexahistidin
HMW	Hochmolekular
hu	human
HyCoSuL	Hybrid Combinatorial Substrate Library
K	Kontrolle
k _{cat}	Umsetzungsrate
KEX2	Prohormon-Prozessierungsendopeptidase
K _i	Dissoziationskonstante
Konz.	Konzentration
L-2-Nal	L-2-Naphtylalanine
L-Ala(Bth)	3-(Benzothiazol-2-yl)-L-alanine
L-Bta	Benzothienyl-L-alanin
L-Chg	L-Cyclohexylglycin
L-Cys(Bzl)	S-benzyl-L-cystein
L-hCha	Hydroxycyclohexylalanin
L-Hnv	5-Hydroxynorvalin
L-Hyp	L-4-Hydroxyprolin
L-NptGly	L-Neopentylglycin
L-Oic	L-Octahydroindol-2-carboxylsäure
L-Phg	L-Phenylglycin
L-Tyr(Bzl)	L-O-Benzyl-L-tyrosin
LB	Luria-Bertani Medium
LBTI	Lima Bean Trypsin Inhibitor
M	Marker
MeOSuc	N-Methoxysuccinyl
MRE	mittlere molare Elliptizität
S	Siemens
mTryptase	monomere Tryptase
Mut ⁺	Methanol utilization plus

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Mut ^S	Methanol utilization slow
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NK, PK	Negativ-, Positivkontrolle
OD _x	Optische Dichte bei x Nanometern
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PBST	Phosphate buffered saline + Tween-20
PEP4	Genesequenz der Proteinase A
PHM	Peptid Histidin-Methionin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Protein _{ges}	Gesamte Proteinmenge
proTyrΔC	Genesequenz des Zymogens der Tryptase γ
PTP	pH-Testpuffer
RF	Relative Fluoreszenz
rh	rekombinant human
rLDTI	rekombinant leech-derived Inhibitor
rTyrΔC	Genesequenz der katalytischen Domäne der Tryptase
SBTI	Soy Bean Trypsin Inhibitor
sc	single chain, Einzelkette
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TGII/IV	Kaninchen anti-Tryptase γ Antikörper
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tos	Schutzgruppe Tosyl
TTP	Tryptase Testpuffer
tTryptase	tetramere Tryptase
TVP	Tryptase Verdünnungspuffer
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
Verd.	Verdünnung
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast extract peptone dextrose
Z	Benzyloxycarbonyl
α1PI	α1-Proteinase Inhibitor

1 Zusammenfassung

Mastzellen sind als Effektorzellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort in eine Vielzahl physiologischer Prozesse wie Wundheilung und Parasitenabwehr involviert, jedoch auch ursächlich an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen wie Allergie, Asthma und Arthritis beteiligt. Aktivierte Mastzellen sezernieren sowohl neu synthetisierte als auch in Granula gespeicherte Mediatoren, innerhalb derer die Tryptasen quantitativ dominieren. Die humanen Tryptasen werden durch die vier Gene *TPSAB1*, *TPSB2*, *TPSG1* und *TPSD1* kodiert, auf Proteinebene wird zwischen den Tryptasen α , β , γ und δ unterschieden. Innerhalb der Gruppe sind die Tryptasen α , β und δ eng verwandt ($> 80\%$ Aminosäure-Sequenzidentität), während Tryptase γ nur ca. 50 % Identität aufweist und sich durch eine zusätzliche hydrophobe C-terminale Domäne unterscheidet. Die Tryptasen α und β sind funktionell und strukturell gut charakterisiert und werden als Biomarker für Mastzellen und ihre Aktivierung verwendet.

Um Tryptase γ analog den Tryptasen α und β zu charakterisieren, wurden das Zymogen und die enzymatisch aktive reife Protease rekombinant hergestellt. Wie auch bei anderen Tryptasen führt die Expression in *E. coli* zur Bildung von Einschlusskörperchen; die Herstellung einer aktiven Protease durch Rückfaltung oder Verwendung alternativer Expressionsvektoren und -stämme gelang nicht. Für die Herstellung in der Hefe *Pichia pastoris* wurden Expressionskonstrukte in den Vektoren pPICZ α A und pGAPZ α A kloniert; die Signalsequenz der Tryptase γ wurde dabei durch die des α -Faktor-Sekretionssignals und die C-terminale hydrophobe Domäne durch einen c-myc/His₆-Tag ausgetauscht. Das γ Zymogen wird von *P. pastoris* mit korrekt prozessiertem N-Terminus in das Medium sekretiert; durch Metall-Affinitätschromatographie wurden ca. 9 mg mit $\geq 98\%$ Reinheit pro Fermentation (5 l) gewonnen. Die Expression der reifen Form der Tryptase γ führt dagegen zur Bildung von Aggregaten, die auf die zwei freien Cysteinreste C145 und C154 zurückgeführt wurden. Nach Mutagenese der einzelnen bzw. beider Cysteine zu Alanin wurden lösliche Proteine exprimiert, die in den Hefeüberstand sekretiert werden. Dabei wurde mit der Doppelmutante die höchste Expressionsausbeute der enzymatisch aktiven Protease erzielt; die Ausbeute wurde durch Skalierung der Fermentation vom Schüttelkolben in einen 5 l-Bioreaktor nochmals ca. 140-fach gesteigert. Durch eine vierstufige Isolierung mittels Dialyse, Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie wurde die Doppelmutante mit $\geq 98\%$ Reinheit und ca. 60 %-iger Ausbeute aufgereinigt; pro Fermentation wurden ~50 mg der aktiven Protease gewonnen.

Die rekombinante Tryptase γ C145A/C154A/ Δ Cterm-Doppelmutante (rhTryptase γ) zeigt wie auch Tryptase β Trypsin-ähnliche enzymatische Aktivität, während das γ -Zymogen erst nach

Prozessierung zur reifen Protease aktiv ist. Gelfiltrationsanalysen zeigten, dass rhTryptase γ als Monomer enzymatisch aktiv ist, während die Tryptasen α und β Tetramere ausbilden und β als Monomer weitgehend inaktiv ist. Heparin, das enzymatisch aktive β Tetramere bindet und stabilisiert, hat dagegen keinen Einfluss auf die Aktivität und keine mittels Affinitätschromatographie nachweisbare Affinität zur rhTryptase γ .

Die Tryptasen γ und β weisen gemeinsame, z. T. jedoch auch deutlich divergierende funktionelle Eigenschaften auf. Beide Tryptasen haben pH-Optima im neutralen Bereich zwischen 7 und 8, im Gegensatz zu β ist rhTryptase γ auch im sauren pH bis ca. 5,5 enzymatisch aktiv. Die rhTryptase γ bevorzugt Substrate mit Arginin an P1, während Tryptase β auch Lysin akzeptiert. Der Vergleich mittels Peptid-Substratbibliotheken zeigt, dass rhTryptase γ an P2 große, hydrophobe Reste und Tryptase β kleine polare Aminosäuren bevorzugt. Die Tryptasen weisen an den Positionen P3 und P4 sehr ähnliche Präferenzen für basische bzw. aliphatische Reste auf. RhTryptase γ ist in der Lage, einige Peptid- und Proteinsubstrate wie CGRP, Fibrinogen und Kininogen zu spalten, die als physiologisch relevante Substrate der Tryptase β angesehen werden; die Spaltungsmuster sind jedoch z. T. deutlich unterschiedlich. Auch die Interaktion mit Inhibitoren zeigt übereinstimmende und abweichende Eigenschaften: Typische Inhibitoren Trypsin-ähnlicher Serinproteasen wie Pefabloc SC und Benzamidin, aber auch APC-366 – ein als Tryptase β -spezifisch angesehener Inhibitor – hemmen beide Proteasen, während andere Inhibitoren wie SBTI bzw. rLDTI nur rhTryptase γ oder β hemmen und damit zwischen den Proteasen diskriminieren.

Zum immunologischen Nachweis der Tryptase γ wurden polyklonale Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit rhTryptase γ erzeugt. Die gewonnenen Antiseren zeigten ausgeprägte Kreuzreaktivität mit Tryptase β ; nach positiver und negativer Selektion mittels Affinitätschromatographie konnten schließlich spezifische Antikörper für beide Tryptasen isoliert werden, die derzeit für die Immunhistologie und die Entwicklung von ELISAs verwendet werden.

Durch die rekombinante Expression des Zymogens und den enzymatisch aktiven Tryptase γ -Varianten stehen jetzt erstmals ausreichende Mengen dieser Protease für funktionelle und strukturelle Untersuchungen zur Verfügung. Im Vergleich zu Tryptase β hat rhTryptase γ überlappende, im Detail aber auch divergierende Eigenschaften, die sowohl synergistische als auch eigenständige physiologische Funktionen implizieren. Mit der Analyse der Substratspezifität und der Affinität zu Inhibitoren sowie der Generierung von Antikörpern wurden erste Werkzeuge bereitgestellt, die eine gute Basis für den Nachweis und die Diskriminierung beider Proteasen sind und damit eine Analyse ihrer Funktionen bei Mastzell-vermittelten Prozessen in Physiologie und Pathophysiologie ermöglichen.

2 Summary

Mast cells are effector cells involved in many facets of innate and acquired immune responses ranging from wound healing and parasite defense to chronic inflammation and autoimmune diseases. After activation, mast cells secrete a wide array of newly synthesized as well as pre-formed, granule-stored mediators. Within the latter group, tryptases are most prominent. In man, these serine proteases are encoded by the four genes *TPSAB1*, *TPSB2*, *TPSG1* and *TPSD1*, on the protein level the tryptases α , β , γ and δ can be distinguished. Among them, α , β and δ are closely related (> 80 % amino acid sequence identity), whereas tryptase γ shows only ~ 50 % sequence identity and differs in an additional C-terminal hydrophobic domain. Tryptases α and β have been structurally and functionally well characterized and are used as biomarkers for mast cells and their activity.

To characterize tryptase γ in comparison to the other tryptases, we have recombinantly expressed the zymogen and the mature form. Similar to other tryptases, heterologous expression in *E. coli* leads to the formation of inclusion bodies, and refolding did not yield in a functional protein. For the production in the yeast *Pichia pastoris*, expression constructs were cloned in the vectors pPICZ α A and pGAPZ α A, replacing the signal peptide by an α -factor secretion signal and the C-terminal hydrophobic domain by a c-myc/His₆-tag. Using this approach, the tryptase γ -zymogen is secreted into the media of *P. pastoris* with a correctly processed N-terminus. After isolation by metal affinity chromatography approx. 9 mg with ≥ 98 % purity per fermentation process (5 l) were obtained. The mature form is also secreted into the media, but forms disulfide-bridged aggregates. Using mutagenesis, aggregation was shown to involve two cysteine residues C145 and C154 that are not present in other tryptases. After exchange to alanine, soluble proteins were expressed and secreted into the supernatant. Highest expression yields of enzymatically active protease were obtained with the tryptase γ C145A/C154A/ Δ Cterm double mutant (rhtryptase γ). The yield was increased 140 fold by upscaling of the fermentation process from shaking flasks to a 5 l bioreactor. Using a four-step purification protocol, approx. 50 mg of rhtryptase γ were isolated with ~60 % yield and ≥ 98 % purity.

Like tryptase β , the recombinant rhtryptase γ has trypsin-like enzymatic activity, while the zymogen is active only after processing to the mature form. Size exclusion chromatography revealed that rhtryptase γ is active as a monomer, while tryptases α and β form tetrameric structures. Heparin, which is required for the stabilization of the enzymatic active tryptase β -tetramer, neither binds to nor influences the enzymatic activity of rhtryptase γ .

The tryptases γ and β exhibit common, but to some extent also divergent functional properties. Both tryptases have a pH optimum in the neutral range between 7 and 8, but rhtryptase γ is also active at acidic pH 5.5. Rhtryptase γ prefers substrates with arginine at position P1, whereas β also accepts lysine. Comparative analysis of the extended substrate specificities of both tryptases using peptide substrate libraries revealed that rhtryptase γ prefers bulky and hydrophobic residues at P2, whereas tryptase β favors small and polar amino acids at this position. Both tryptases have similar preferences for basic and aliphatic residues at positions P3 and P4, respectively. Rhtryptase γ is capable to hydrolyze peptide and protein substrates like CGRP, fibrinogen and kininogen that are thought to be physiologic relevant substrates of tryptase β , but the cleavage patterns differ. Likewise, the interaction with inhibitors shows similar and divergent properties: typical inhibitors of trypsin-like serine proteases such as Pefabloc SC and benzamidine, as well as APC366 – considered to be a tryptase β -specific inhibitor – inhibit both proteases. However, we identified some inhibitors such as SBTI and rLDTI that inhibit either tryptase γ or β , respectively, and thus can be used to discriminate between these proteases.

For the immunological detection of tryptase γ we produced polyclonal antibodies by immunizing rabbits. The crude antisera showed a high degree of cross-reactivity with tryptase β , but specific antibodies against both tryptases were isolated after positive and negative selection by affinity chromatography. These immunopurified polyclonal antibodies are currently used for immune histology and the development of ELISAs.

The recombinant expression of both the zymogen and the enzymatically active tryptase γ variants and the availability of sufficient amounts of this protease now largely facilitate functional and structural studies. The results show that compared to tryptase β , rhtryptase γ has overlapping but in detail also divergent properties that implicate both synergistic and independent physiologic functions. By analyzing the substrate specificity, the affinity of inhibitors and by generation of antibodies, we have developed tools that are a good basis for the detection and discrimination of both proteases and the analysis of their functions, especially in regard to mast cell-mediated processes in physiology and pathophysiology.

3 Einleitung

3.1 Die humane Mastzelle

Mastzellen wurden erstmals im Jahr 1878 von Paul Ehrlich beschrieben, der nach histologischer Färbung mit neuartigen Anilinfarben im Bindegewebe Zellen identifizierte, die durch eine starke metachromatische Anfärbung von prominenten Granula auffielen. Ehrlich beobachtete ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen nach chronischen Entzündungen, bei Lungenfibrose sowie bei Karzinomen, d. h. Erkrankungen, die damals auf einen lokal gesteigerten Ernährungszustand des Gewebes zurückgeführt wurden. Daher folgerte er, dass sich die Zellen aus den fixen Bindegewebszellen entwickeln und Produkte der Mästung der Bindegewebszellen sind, und nannte sie Mastzellen (Abb. 3.1-1) [1-3].

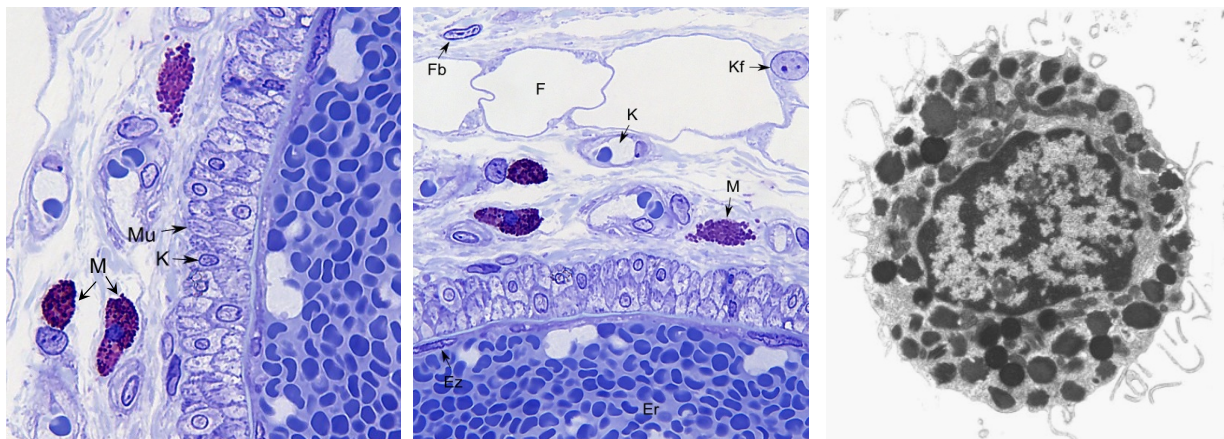


Abb. 3.1-1: Histologischer Schnitt des Bindegewebes der Speiseröhre nach Toluidinfärbung und elektronenmikroskopische Aufnahme einer humanen Mastzelle. Links und Mitte: Mastzellen (M) im Bindegewebe der Speiseröhre einer Ratte (links, Mitte) [4]; Mu Muskelzelle; K Kapillare; Fb Fibroblast; F Fettzelle; Kf Kern einer Fettzelle. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer humanen Mastzelle [5].

Inzwischen ist jedoch deutlich geworden, dass Mastzellen hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entstammen und im Gewebe unter dem Einfluss von Gewebefaktoren wie SCF (Stammzellfaktor) differenzieren [6]. Sie können so zu Mastzellen des Bindegewebes (MC_{TC}) oder der Schleimhäute (MC_T) transdifferenzieren, die sich durch ihre Morphologie und die Expression der Proteasen Chymase, Carboxypeptidase A3, Cathepsin G und Tryptase unterscheiden [7-9]. Durch die strategische Lokalisierung in an die Umwelt grenzenden Geweben wie der Haut, den Bronchien und dem Verdauungssystem [10] vermitteln sie die Immunabwehr gegen bakterielle und parasitäre Infektionen, die Neutralisierung von Schlangengiften und stimulieren die Angiogenese und Geweberneuerung bei der Wundheilung [1, 11]. Andererseits sind Mastzellen durch ihre Beteiligung in pathophysiologischen Prozessen wie Asthma, Allergie und Anaphylaxie bekannt [12-14].

Diese konträren physiologischen und pathophysiologischen Effekte ergeben sich u. a. durch die Vielzahl von Mediatoren, die die Mastzelle nach Aktivierung sezernieren kann.

Die Aktivierung der Mastzelle kann über verschiedene Wege erfolgen. Am besten ist die Aktivierung über FcεRI-Rezeptoren beschrieben, die nach hochaffiner Bindung Antigen-gebundener Immunglobuline E (IgE) Cluster ausbilden und zur Degranulierung der Mastzelle führen [15]. Alternativ können Mastzellen über Fcγ-Rezeptoren und verschiedene Komplementrezeptoren aktiviert werden, die auf ein aktiviertes Komplementsystem und opsonisierte Organismen reagieren [16]. Die Expression von Toll-like-Rezeptoren (TLR) an der Zelloberfläche lässt zudem eine Aktivierung durch direkte Mustererkennung von Pathogenen zu [17]. Schließlich wurden auch Purinorezeptoren P2X7 auf der Oberfläche von Mastzellen identifiziert, die extrazelluläres ATP binden und damit auf verschiedene Stressfaktoren wie Nekrose und bakterielle Infektion reagieren [18].

Die Mediatoren der Mastzelle umfassen zum einen präformierte Mediatoren, die in den Granula gelagert sind und nach Aktivierung der Mastzellen innerhalb von Sekunden durch Degranulierung in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Dazu gehören Histamin, Proteoglykane wie Heparin und verschiedene Proteasen. Mastzellen exprimieren eine Reihe von verschiedenen Proteasen, die bis zu 25 % ihres Proteingehalts ausmachen und für die

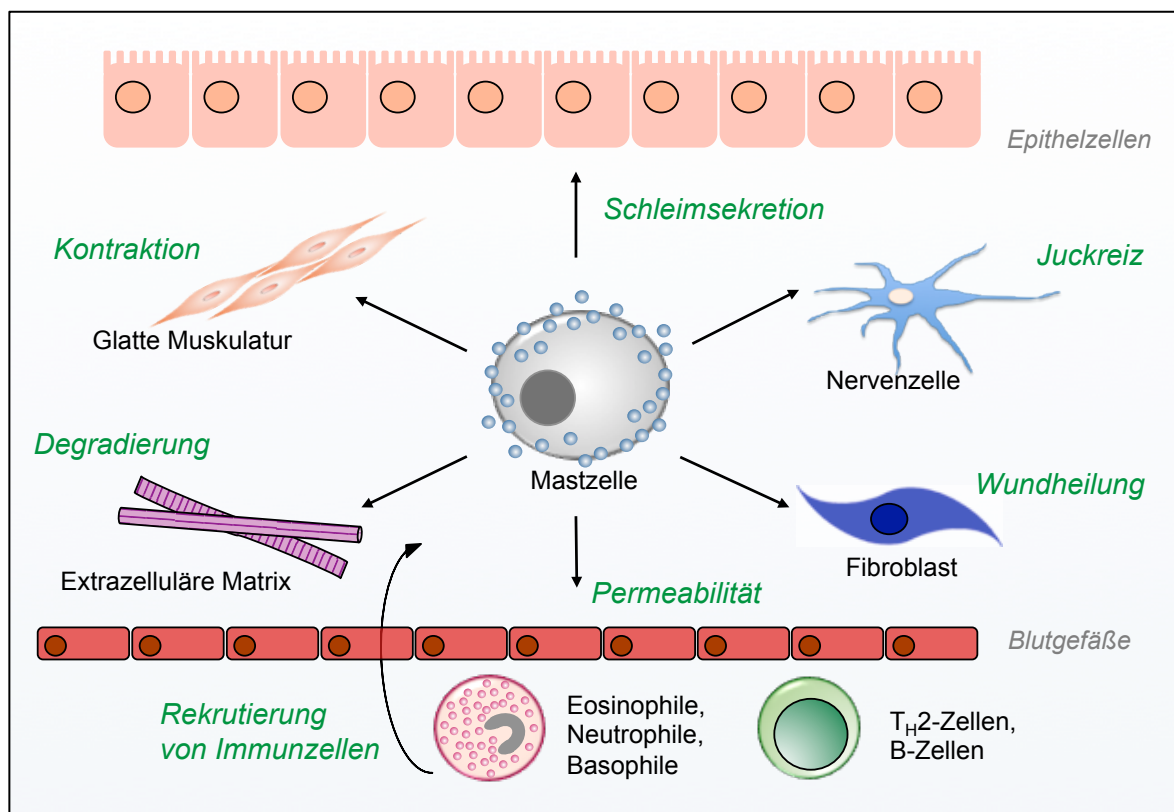


Abb. 3.1-2: Schematische Darstellung (patho)physiologischer Effekte einer aktivierten Mastzelle. Nach Aktivierung und Degranulierung der Mastzelle werden Mediatoren freigesetzt, die zur Degradierung der extrazellulären Matrix, Kontraktion von Muskelzellen, Schleimsekretion, Juckreiz und Wundheilung führen. Zudem wird die Permeabilität der Blutgefäße erhöht und Immunzellen in das Gewebe rekrutiert. Ausgehend von Sommerhoff, 2001, und Abraham, 2010 [6, 19].

Mastzelle spezifisch sind [20]. Darunter zählen die Metalloproteinase Carboxypeptidase A3, die Chymotrypsin-ähnliche Serinprotease Chymase und die Familie der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen Tryptase. Zum anderen sekretieren aktivierte Mastzellen nach wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden neu synthetisierte Mediatoren, die wie die Prostaglandine und Leukotriene aus Lipiden gebildet werden und verschiedene Cytokine wie z. B. TNF und Interleukine, die erst transkribiert werden müssen [6, 21].

Über diese Mediatoren regulieren Mastzellen z. B. die Kontraktion der glatten Muskulatur, die Schleimsekretion von Epithelzellen, die Degradierung der extrazellulären Matrix, die Ausbildung eines Juckreizes durch Aktivierung von Nervenzellen, die Wundheilung durch Aktivierung von Fibroblasten und die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Infektion (Abb. 3.1-2) [19].

3.2 Die Tryptase-Familie

Die Familie der Tryptasen umfasst vier verschiedene Serinproteasen, Tryptase α , β , γ und δ , die auf dem Chromosom 16p13.3 durch vier Gene (*TPSAB1*, *TPSB2*, *TPSG1* und *TPSD1*) kodiert sind [22-25]. Auf Aminosäureebene zeigen die Tryptasen α , β und δ eine hohe Sequenzidentität von ca. 90 %, während sich die Tryptase γ mit etwa 50 % Identität deutlich von den anderen Tryptasen unterscheidet [26]. Die Tryptasen werden als Präproproteine selektiv in den humanen Mastzellen und zu einem sehr geringen Anteil auch in basophilen Granulozyten exprimiert [27, 28]. In humanen Mastzellen können sie bis zu 25 % des gesamten Proteingehalts ausmachen [27], nicht zuletzt aus diesem Grund werden ihnen viele Funktionen in den physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen der Mastzellen zugesprochen.

3.2.1 Die Gene *TPSAB1* und *TPSB2*

Die Gene *TPSAB1* und *TPSB2* kodieren für die allelischen Varianten Tryptase α und β I bzw. β II, β III und β III^{FS} [23, 29]. Die Allele Tryptase α und β III^{FS} führen aufgrund eines Aminosäureaustauschs im aktiven Zentrum bzw. einer Leserasterverschiebung zu enzymatisch inaktiven Formen und werden daher als dysfunktionale Allele angesehen [30-32]. Sie treten mit einer Prävalenz von 70 % bzw. 15 % (Tryptase α bzw. β III^{FS}) in der Weltbevölkerung auf, sind jedoch in verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich verteilt: Das Tryptase α -Allel ist bei 82 % und 70 % der Individuen asiatischer bzw. europäischer Abstammung vorhanden, jedoch nur bei 55 % der Individuen afrikanischer Herkunft [33, 34]. Das Tryptase β III^{FS}-Allel wurde dagegen bei 19 % und 23 % afrikanischer und europäischer Personen detektiert, nicht aber bei asiatischen Personen [32]. Es wurde beobachtet, dass die dysfunktionalen Allele weitgehend mit funktionalen Allelen der Tryptase β gemeinsam vererbt

werden: α mit β II und β III^{FS} mit β I, Individuen ohne funktionale Tryptase β -Allele wurden bisher nicht identifiziert, alle untersuchten Populationen hatten zwei bis vier aktive Gene. Dies lässt die Vermutung zu, dass aktive Tryptase β -Allele essenziell sind und dass die Dosis aktiver Gene eventuell in Zusammenhang mit Tryptase- bzw. Mastzell-assoziierten Krankheiten relevant ist [32].

3.2.2 Tryptase β

Mit bis zu 35 pg/Zelle ist Tryptase β die vorherrschende Protease der humanen Mastzelle [27]. Unter diesen Namen werden die Isoenzyme β I, β II und β III zusammengefasst, die sich nur in wenigen Aminosäuren sowie der Anzahl der Glykosylierungsstellen unterscheiden (β I und β III mit zwei, β II mit einer Glykosylierungsstelle) [23, 29]. Auch funktionell zeigen die Isoenzyme gegenüber Substraten und Inhibitoren keine oder nur geringfügige Unterschiede [35, 36].

Tryptase β wird als Präpropeptid exprimiert und nach Abspaltung des Signalpeptids in einem zweistufigen Prozess im sauren Milieu der Mastzell-Granula aktiviert, d. h. durch Autokatalyse am Aminosäurerest R-3 und Prozessierung durch die Dipeptidyl Amino-peptidase Cathepsin C [37]. Als alternativer Aktivierungsmechanismus wurde die direkte Prozessierung durch die Proteasen Cathepsin B und L beschrieben, die ebenfalls in Mastzellen vorkommen [38]. Tryptase β wird als aktive Protease in den Granula gelagert, in denen ihre enzymatische Aktivität durch das saure Milieu, die Interaktion mit Salzen sowie durch die dichte Packung mit Proteoglykanen reguliert wird [39]. Nach Aktivierung und Degranulierung der Mastzelle wird Tryptase β zusammen mit Heparin und Histamin in den Extrazellulärraum sezerniert. Dort ist sie als Tetramer enzymatisch aktiv [40], einem in Abhängigkeit von Heparin gebildeten, nicht-kovalenten Homo-Oligomer mit einer Größe von etwa 130 kDa (Abb. 3.2-1) [41]. Die Röntgen-Strukturaufklärung im Jahr 1998 zeigte, dass Tryptase β eine ringartige quaternäre Struktur aus vier Monomeren bildet, die durch die Bindung des negativ-geladenen Heparins an positiv-geladene Reste auf den Monomeren stabilisiert wird [42]. Der Verlust der Heparinbindung führt deshalb zur Dissoziation des Tetramers und zu Monomeren, die im neutralen bzw. leicht basischen pH weitgehend inaktiv sind [43, 44]. Im Tetramer sind die aktiven Zentren der vier Monomere zu der zentralen Pore hin ausgerichtet, die mit einem Durchmesser von 25 x 50 Å den Zugang für Peptide mit einem Durchmesser einer α -Helix zulässt [42]. Daher ist Tryptase β gegenüber der Bindung von makromolekularen, natürlich vorkommenden Inhibitoren wie Serpinen, α_2 -Makroglobulin und Aprotinin resistent [40]. Einer der wenigen Protein-Inhibitoren der Tryptase β ist der atypische Kazal-Typ *Leech-derived Trypsin Inhibitor* (LDTI), der durch seine kleine Größe von etwa 5 kDa an zwei der vier aktiven Zentren der Tryptase β binden kann [45, 46]. Unter

physiologischen Bedingungen wird die enzymatische Aktivität der Tryptase β damit maßgeblich durch Assoziation der Monomere bzw. Dissoziation der Tetramere und der Interaktion mit Proteoglykanen reguliert, nicht dagegen durch Inhibitoren.

In vitro war es möglich, auch Tryptase β Monomere auszubilden, die im sauren pH bei 6,0 und in Anwesenheit von kurzkettigem Heparin (≤ 10 Disaccharide/Molekül) enzymatisch aktiv sind. Unter diesen Bedingungen spaltet monomere Tryptase β auch makromolekulare Substrate wie Fibronektin und wird von Inhibitoren wie Aprotinin, Serpinen sowie SBTI gehemmt, ist jedoch schwächer aktiv als das Tetramer [40, 43, 44, 47, 48]. Inwieweit diese Monomere *in vivo* z. B. in Mastzell-Granula existieren und aktiv sind, ist bisher unklar.

Tryptase β spaltet Substrate C-terminal der basischen Reste Arginin und Lysin. Die Untersuchung der erweiterten Substratspezifität hat Präferenzen für Asparagin an P2, basische Reste an P3 und Prolin an P4 aufgezeigt (Schechter und Berger Nomenklatur) [19, 36]. Aufgrund der geringen Größe der zentralen Pore ist der Zugang für biologisch relevante Substrate zu den aktiven Zentren des Tryptase β -Tetramers jedoch limitiert. So wurden insbesondere kleine Substrate wie die Neuropeptide *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP), vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Peptid Histidin Methionin (PHM) als potenziell relevante Substrate identifiziert [49]. Die Degradierung dieser Neuropeptide durch Tryptase β modifiziert die neuronale Transmission und kann z. B. zur Bronchokonstriktion führen [50].

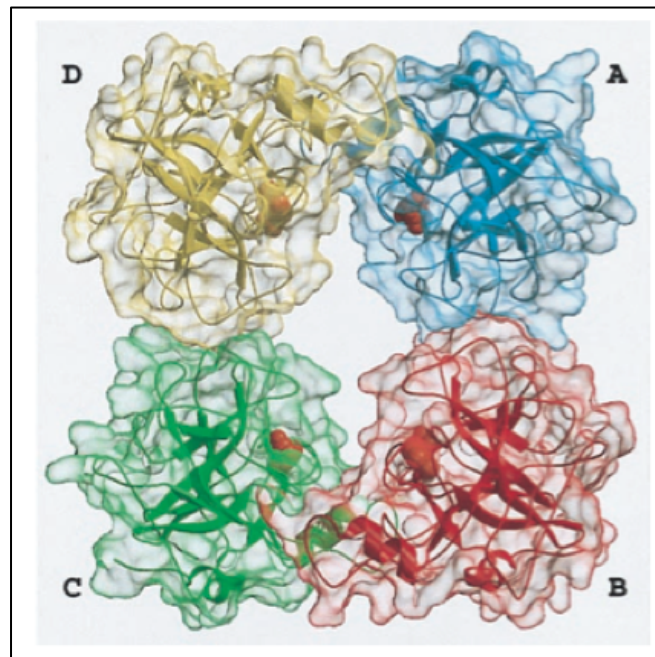


Abb. 3.2-1: 3D-Struktur der Tryptase β . Das Tetramer der Tryptase β ist aus vier Monomeren aufgebaut, die über sechs Oberflächenschleifen interagieren und einen rechteckigen, flachen Rahmen bilden. Die aktiven Zentren der Monomere sind in Richtung der zentralen Pore ($\varnothing 15 \times 40$ Å) ausgerichtet. Jedes der vier Monomere bindet ein Inhibitionsmolekül APP (orange, Kalottenmodell; 4-Amidinophenylbrenztraubensäure), das in der jeweiligen S1-Substratbindungstasche lokalisiert ist. Nach Sommerhoff et al. [42].

Im Gegensatz zu Peptidsubstraten wurden bisher nur wenige Proteinsubstrate identifiziert, was der Tetramerstruktur bzw. der geringen Porengröße entspricht. Eine Voraussetzung für die Spaltung makromolekularer Substrate ist, dass diese spaltbare Oberflächenschleifen präsentieren, die $> 20 \text{ \AA}$ aus der Struktur herausragen, um an die aktiven Zentren der Tryptase β binden zu können [22]. So ist Tryptase β in der Lage, die Zymogene pro-MMP3 und Prourokinase zu aktivieren und die Proteine Fibronektin sowie Collagen I zu inaktivieren bzw. zu degradieren [19]; Tryptase β kann so die Umgestaltung und den Abbau der extrazellulären Matrix und viele nachfolgende Prozesse wie Wundheilung, Embryogenese und Metastasierung von Tumorzellen beeinflussen [51-54]. Die Spaltung der α -Kette des Fibrinogens durch Tryptase β führt zum Verlust der Erkennungsstelle des Thrombins, sodass Tryptase β eine antikoagulatorische Wirkung hat [55-57]. Die Degradierung des hochmolekularen Kininogens durch Tryptase β kann ebenfalls auf eine antikoagulatorische Funktion hinweisen [58, 59]. Diese Funktion, die nach Mastzell-Degranulierung beobachtet wurde und mit Vasodilatation und Ödembildung assoziiert wurde, wurde lange allein den Proteoglykanen (u. a. Heparin) zugeschrieben, die in diesem Zusammenhang jedoch nur indirekt wirken, da sie das Tryptase β -Tetramer stabilisieren [60].

Der Einfluss der sterischen Hemmung aufgrund der Tetramerstruktur wird auch durch die Prozessierung des Kininogens durch Tryptase β verdeutlicht. *In vitro* wurde gezeigt, dass Tryptase β allein nicht in der Lage ist, aus Kininogen Kinine zu bilden, jedoch zusammen mit neutrophiler Elastase: Die Spaltung des Kininogens durch Elastase führt zunächst zu Fragmenten, die klein genug sind, um von Tryptase β prozessiert zu werden. Im Gegensatz zu Plasma- oder Gewebekallikrein kann die Tryptase β /Elastase-Mischung auch oxidiertes Kininogen spalten, sodass diese Prozessierung als alternativer Mechanismus zur Kininbildung unter oxidativen Bedingungen wie z. B. an Entzündungsstellen vermutet wird [61]. Ebenso konnte beobachtet werden, dass Tryptase β in Anwesenheit von Präkallikrein eine erhöhte vaskuläre Permeabilität durch Prozessierung von Kininogen zu Bradykinin induzieren kann [62].

Tryptase β aktiviert den Protease-aktivierten Rezeptor 2 (PAR-2) [63]. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor wird durch eine Spaltung am extrazellulären N-Terminus aktiviert, bei der ein gebundener Ligand freigelegt wird, dessen Bindung an die zweite extrazelluläre Schleife zur Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade führt [40]. PAR-2 ist auf Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen, Neuronen und Gliazellen in verschiedenen Geweben wie den Nieren, Pankreas, Darm, Atemwegen sowie Haut exprimiert [64]. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch Tryptase β ist abhängig vom jeweiligen Gewebe mit physiologischen und pathophysiologischen Prozessen assoziiert wie dem Juckreiz durch Aktivierung von Neuronen in der Haut [65] oder der Aktivierung der asthmatischen bronchialen glatten Muskulatur [66].

Trotz der limitierten Zahl bekannter Substrate ist die Aktivität der Tryptase β sowohl mit physiologischen als auch pathophysiologischen Funktionen assoziiert. Da Tryptase β die vorherrschende Protease in humanen Mastzellen ist und nach Mastzell-Aktivierung ein erhöhtes Tryptase-Level im Serum messbar ist, wurde sie lange Zeit jedoch vor allem mit Krankheiten in Verbindung gebracht wie Anaphylaxie, Asthma, allergischen Entzündungsreaktionen und entzündlichen Darmerkrankungen [22, 67]. Seitdem wird Tryptase β als potenzielles Ziel für die Medikamentenentwicklung zur Behandlung Mastzell-assoziiierter Krankheiten betrachtet. So wurden Tryptase-Inhibitoren wie APC-366, RWJ-58643 und APC-2059 in klinischen Studien z. T. in Phase II auf ihre therapeutische Wirkung in allergischem Asthma, allergischer Rhinitis bzw. Colitis ulcerosa untersucht [68-70]. Jedoch zeigten die Inhibitoren meist nur geringe Wirkung. Insgesamt wird die Entwicklung von Tryptase-Inhibitoren durch Probleme der Selektivität, Wirksamkeit und Bioverfügbarkeit erschwert, was auch die geringe Zahl klinischer Studien erklären könnte [14, 20, 22, 50, 67, 71, 72].

Neben den pathophysiologischen Effekten wurde Tryptase β in den letzten Jahren mit einigen physiologischen Prozessen wie der Wundheilung assoziiert. Mittlerweile wird ihr auch eine protektive Rolle z. B. bei der Abwehr bakterieller sowie parasitärer Infektionen [73] und der Degradierung von Schlangengiften zugesprochen [74], sodass sogar eine therapeutische Anwendung in Betracht gezogen wird.

3.2.3 Tryptase α

Die Nukleotidsequenz der Tryptase α zeigt eine sehr hohe Sequenzidentität von 98 % zu Tryptase β , die zu einer Identität von 93 % auf Aminosäureebene führt [33]. Trotz dieser hohen Sequenzidentität hat Tryptase α einige einzigartige Eigenschaften. Im Vergleich zu Tryptase β führt ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Glutamin an Position -3 (R-3Q) zur Blockierung der Autoprocessing [75]. Immunologische Analysen weisen darauf hin, dass die Proformen der Tryptase α sowie β ins Medium der Mastzelllinien Mono-Mac-6 bzw. HMC-1 und aus Haut isolierter Mastzellen sekretiert werden, während die reifen Formen der Tryptasen in den sekretorischen Granula gelagert werden [76]. Da lange kein physiologisch relevanter Prozessierungsmechanismus der Protryptase α bekannt war, wurde davon ausgegangen, dass Tryptase α nicht in den Granula gelagert wird, sondern als Zymogen konstitutiv oder spontan sekretiert wird [76, 77]. *In vitro* konnte Le *et al.* [38] jedoch zeigen, dass rekombinante Protryptase α wie Protryptase β von Cathepsin B und L direkt prozessiert werden kann. Ob Tryptase α durch diese Proteasen *in vivo* prozessiert wird und wie Tryptase β als reife Protease in den sekretorischen Granula gelagert wird, ist bisher nicht bekannt.

Die Strukturaufklärung zeigte, dass rekombinante Tryptase α ebenso wie Tryptase β eine tetramere Struktur mit vier aktiven Zentren ausbildet, die zu einer zentralen Pore gerichtet sind [30, 31]. Jedoch zeigt Tryptase α nur sehr geringe enzymatische Aktivität, die auf einen Aminosäureaustausch an der Position 216 von Glycin zu Aspartat zurückgeführt werden konnte [30, 31]. Durch die Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass das Asp216 in die S1-Tasche bindet und mit dem *Oxyanion Hole* interagiert. Diese Bindung scheint gegenüber der Bindung eines P1-Restes eines Substrats energetisch bevorzugt zu sein und führt außerdem zu einem Knick im Trp215-Gly219-Segment in der Nähe der Substratbindestelle S1, sodass der Zugang des Substrats zur Substratbindestelle verhindert ist (Abb. 3.2-2) [30, 79].

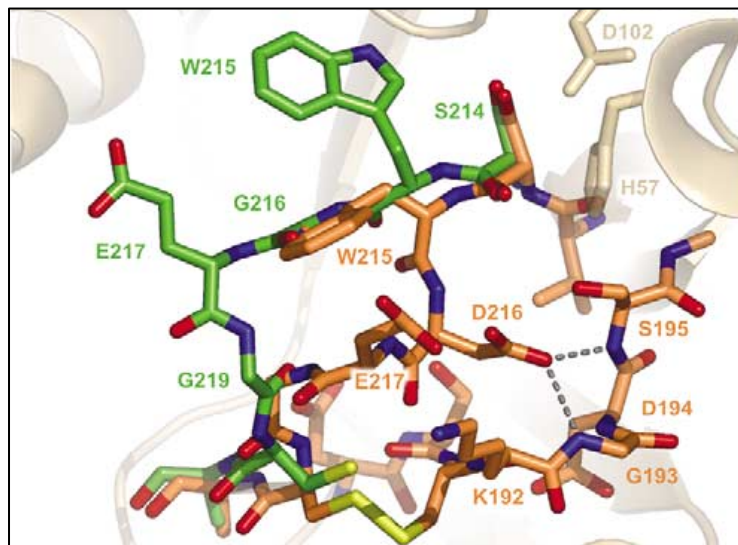


Abb. 3.2-2: Stäbchenmodell des aktiven Zentrums der Tryptase α (orange) [78]. Das Asp216 interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen (grau) mit Ser195 und Gly193. Dies verursacht einen Knick im Trp215-Gly219-Segment und verhindert den Zugang zur S1-Bindungstasche. Das S214-G219-Segment der Tryptase β (grün) weist eine offene Konformation auf, sodass die S1-Bindungstasche für Substrate zugänglich ist.

Tryptase α und β unterscheiden sich darüber hinaus in einigen Aminosäuren der Schleifen, die die Monomer-Monomer-Kontakte ausbilden. Es konnte gezeigt werden, dass das Tryptase α -Tetramer Heparin binden kann, jedoch die Stabilisierung der Konformation nicht von Heparin abhängig ist [30, 31]. Aufgrund der hohen Sequenzidentität der Tryptase α mit Tryptase β war bisher eine Unterscheidung der beiden Tryptasen auf immunologischer Ebene nicht möglich. Außerdem zeigt Tryptase α nur sehr geringe enzymatische Aktivität, sodass eine funktionelle Charakterisierung nicht möglich war und bis heute noch wenig über die physiologische Funktion der Tryptase α bekannt ist.

Die Defizienz bzw. unterschiedliche Verteilung des Tryptase α -Allels des Gens *TPSAB1* in verschiedenen ethnischen Gruppen [33, 34] konnte bisher noch nicht eindeutig mit einer Suszeptibilität für Krankheiten wie allergische Erkrankungen oder systemische Mastozytose in Verbindung gebracht werden: Während Caughey *et al.* davon ausgehen, dass Tryptase α nicht in Asthma impliziert ist [33], zeigten Abdelmotelb *et al.* [80], dass in Asthma-Patienten die Kopienzahl der Tryptase α - auf komplexe Art mit dem IgE-Level im Serum assoziiert ist.

Patienten ohne Tryptase α weisen ein normales Level von totalen und Hausstaubmilben-spezifischen IgE auf, Patienten mit einem Tryptase α -Gen hatten im Vergleich geringere Serumkonzentrationen und Patienten mit zwei Tryptase α -Genen zeigten ein erhöhtes Level dieser Antikörper [80]. Dagegen ist in Patienten mit systemischer Mastozytose die Verteilung der Tryptase-Haplotypen identisch zu der Kontrollgruppe [34]. In einer aktuellen Studie wurde erstmals das Tryptase α -Allel mit schweren Formen des Dengue Fiebers assoziiert. Asiatische Patienten (Vietnam n=1001, Philippinen n=155), die homozygot für das Tryptase α -Allel sind, hatten verglichen zur Kontrollgruppe eine *Odds Ratio* von 2,5 bzw. 4,4 nach einer Infektion hämorrhagisches Dengue Fieber sowie Dengue Schock-Syndrom zu entwickeln [81]. Somit ist dies die erste Studie, die ausgehend von einem Tryptase-Haplotypen eine Prognose über den Schweregrad bzw. die Suszeptibilität einer Krankheit zulässt.

3.2.4 Tryptase δ

Im Jahr 1999 wurde mit Hilfe von BAC (*Bacterial artificial chromosome*) Bibliotheken, *Restriction mapping* und Sequenzierung das Gen *TPSD1* bzw. *mMCP7-like* als neues Mitglied der Tryptase-Familie auf Chromosom 16p13.3 identifiziert. Dieses Gen kodiert für Tryptase δ , die eine > 80 %-ige Sequenzidentität mit Tryptase α besitzt [23]. Wie Tryptase α hat auch Tryptase δ eine R-3Q Mutation im Propeptid, sodass die Aktivierung durch Autoprozessierung und Cathepsin C nicht möglich ist [82]; ob alternativ Cathepsin B und L das Tryptase δ -Zymogen analog zu Tryptase α prozessieren können, ist unklar. Aufgrund einer *Nonsense* Mutation Trp205X ist der C-Terminus der Tryptase δ verglichen zu Tryptase α und β um 40 Aminosäuren verkürzt. Während die katalytische Triade trotz der Verkürzung enthalten ist, fehlen die zwei Glycinreste der Spezifitäts-triade (D188, G215, G225), die in der Ausbildung der Substratbindungstasche bei Tryptase α und β beteiligt sind [82, 83]. Es wird daher angenommen, dass die Deletion der 40 Aminosäuren am C-Terminus einen wesentlichen Einfluss auf die Faltung und Aktivität der Tryptase δ hat.

Da zunächst keine Transkripte des Tryptase δ -Gens in humanem Gewebe und Mastzellen detektiert wurden, wurde davon ausgegangen, dass *TPSD1* ein Pseudogen ist [83]. Jedoch konnten Wang *et al.* (2002) [84] später die Expression der Tryptase δ auf RNA-Ebene v. a. in Dickdarm, Lunge sowie der Mastzelllinie HMC-1 und auf Proteinebene in Gewebeschnitten von humanem Dickdarm nachweisen. Außerdem konnten Wang *et al.* anhand einer rekombinanten, prozessierbaren Tryptase δ geringe enzymatische Aktivität zeigen, die jedoch angezweifelt wird [82, 84]. Darüberhinaus sind die proteinchemischen Eigenschaften der Tryptase δ , die Tertiärstruktur, die Prozessierung des Zymogens, die Lokalisierung in Mastzellen und die Rolle in der Mastzellbiologie unklar.

3.2.5 Tryptase γ

Nach Entdeckung des *TPSD1*-Gens wurde mittels der PCR/RACE-Methode das Gen *TPSG1* (alternativ *PRSS31*) am telomeren Ende des multigenen Tryptase-Locus auf Chromosom 16p13.3 identifiziert. Dieses Gen ist evolutionär konserviert und kodiert für Tryptase γ , die als phylogenetisch ältestes Mitglied der Tryptase-Familie gilt [85]. Es wurden zwei allelische Varianten identifiziert, die zu den Isoenzymen Tryptase γ I und γ II führen und sich in fünf Aminosäureresten unterscheiden (M60V, I126M, S132T, L204I, L288F) (Uniprot Q9NR22) [85, 86].

Auf Aminosäureebene hat humane Tryptase γ eine Sequenzidentität von etwa 50 % mit den anderen Tryptasen. Sie unterscheidet sich v. a. im Propeptid und durch eine zusätzliche hydrophobe C-terminale Domäne [24]. Das Propeptid weist im Gegensatz zu den anderen Tryptasen einen Argininrest an Position -1 (bzw. 37) auf und lässt somit einen tryptischen Aktivierungsmechanismus erwarten, der jedoch bisher nicht näher untersucht wurde [25]. Damit unterscheidet sich die Zymogenprozessierung der Tryptase γ von der der Tryptase β sowie anderer Granula-assoziierten Serinproteasen, die von Cathepsin C abhängig ist [87]. Tryptase γ hat im Vergleich zu anderen Tryptasen drei zusätzliche Cysteinreste, C26 in der Prodomäne und C145 sowie C154 in der katalytischen Domäne. Aufgrund der Analogie zu aktiviertem Chymotrypsin wurde eine Verbindung zwischen C26 und C145 vorausgesagt, die nach Zymogenprozessierung zu einer Zweikettenform der reifen Tryptase γ führen würde und auch mit gentechnisch modifizierten Varianten mit einer Enterokinase-Prozessierungsstelle zwischen Propeptid und katalytischer Domäne bestätigt wurden [25, 26, 88]. Rekombinante humane Tryptase γ ist als Monomer enzymatisch aktiv und zeigt dabei Unterschiede in Substratspezifität und Inhibitionsprofil im Vergleich zur Tryptase β [26, 88, 89]. Aufgrund der hydrophoben Domäne in der Nähe des C-Terminus wird Tryptase γ zu den Typ I Transmembran-Serinproteasen gezählt [90], mit deren Vertretern Proctasin und Testisin sie auch eine etwa 50 %-ige Sequenzidentität besitzt [25]. Allerdings wird bei Proctasin und Testisin die C-terminale hydrophobe Domäne posttranslational durch eine GPI-Verknüpfung modifiziert, die eine Verankerung in die Zellmembran vermittelt [89-92]. Dagegen scheint Tryptase γ mittels ihrer Transmembrandomäne nach Aktivierung und Degranulierung der Mastzelle an der Zellmembran gebunden zu sein [88, 90]. Die Generierung von Chimären mit Proctasin und dem C-Terminus muriner Tryptase γ zeigte, dass eine Prozessierung zur löslichen Form durch Abspaltung der Ektodomäne möglich ist [93].

Tryptase γ konnte in ruhenden, isolierten Mastzellen aus Nabelschnurblut gesunder Probanden und peripheren Blut von Asthmapatienten immunologisch in den Granula und nach Aktivierung der Zellen an der Zelloberfläche nachgewiesen werden [88]. Prinzipiell wurde ihr Vorkommen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in der Mastzelllinie HMC-

1 sowie in verschiedenen Geweben wie z. B. der Haut, der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts sowie in Tumorgewebe beschrieben [24, 25, 94]. Besonders in Gewebeproben des Gastrointestinaltrakts wurde ein hohes Expressionslevel der Tryptase γ mittels Immunhistologie detektiert (Human Protein Atlas) [24, 94]. Im Vergleich dazu wurde Tryptase β im gleichen Gewebe dagegen nur mit einem mittleren Expressionslevel auf Proteinebene nachgewiesen. Allgemein liegt das Transkriptionslevel der Tryptase γ in den Geweben sowie in HMC-1 niedriger als das der Tryptase β .

Basierend auf *in vivo* Studien hat Tryptase γ pro-inflammatorische Wirkung. Die Applikation rekombinanter humaner Tryptase γ in die Atemwege von Mäusen löst nach 24 h eine Atemweg-Hyperreaktivität (AHR) aus, die durch einen IL-13/IL-4R α /STAT6-abhängigen Signalweg vermittelt wird. Rekombinante humane Tryptase β hat dagegen keinen Effekt in diesem Modell [88]. Auch Studien mit Tryptase γ -defizienten Mäusen (Prss31^{-/-} B6 Maus) haben pro-inflammatorische Wirkung der Tryptase γ in Krankheitsmodellen wie experimentelle COPD (chronische obstruktive Lungenerkrankung) sowie Colitis aufgezeigt [95]: In Tryptase γ -defizienten Mäusen wurde eine geringere Zahl an Makrophagen und verminderte Fibrose in den Atemwegen COPD-erkrankter Mäuse beobachtet. Bei dem Modell der Colitis führte die Tryptase γ -Defizienz zu vermehrter Gewichtszunahme, einer erniedrigten Zahl entzündlicher Zellen und verkürzten Dickdärmen. Zusammenfassend zeigen diese *in vivo* Studien eine pro-inflammatorische Wirkung der Tryptase γ , sodass sie als therapeutisches Ziel vielversprechend erscheint.

3.3 Aufgabenstellung

Im Gegensatz zu den Trypsasen α und β wurde Tryptase γ bisher nur ansatzweise charakterisiert [26, 88]. Dies ist z. T. auf die geringen zur Verfügung stehenden Mengen bzw. die geringen Ausbeuten bei der rekombinanten Herstellung zurückzuführen. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit das Zymogen sowie die enzymatisch aktive katalytische Domäne der Tryptase γ präparativ in der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt werden, um ausreichende Mengen für Funktions- und Strukturanalysen bereitzustellen. Insbesondere sollte die Prozessierung des Zymogens sowie die enzymatische Aktivität, Substratspezifität und Interaktion mit Inhibitoren der reifen Protease im Vergleich zur Tryptase β analysiert werden. Darüber hinaus sollte die rekombinante Tryptase γ für die Entwicklung von Testverfahren, für die Generierung von Antikörpern und darauf aufbauenden immunologischen Nachweismethoden genutzt werden.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

4.1.1.1 Geräte für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Bioreaktor Labfors 4, 5 l	Infors HT, Bottmingen
Brutschrank Typ Tv30u	Memmert, Schwabach
Gel-Bilderfassung: Gel Imager	Intas GmbH, Göttingen
Gene Pulser Xcell Elektroporationssystem	Bio-Rad, Hercules, USA
Gene Pulser	
Capacity Extender	
Pulse Controller	
Inkubationsschüttler Typ ITE	Infors HT, Bottmingen
Lichtmikroskop Typ IMT-2	Olympus, Tokio, Japan
Mikrowellenofen HMT84M421	Bosch, Gerlingen
NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnology, Erlangen
Perfect Blue Horizontale Mini Elektrophorese System	Peqlab Biotechnology, Erlangen
Model MiniS 7x8 cm, 30 ml Gelvolumen	
Model MiniExM 23x14 cm, 290 ml Gelvolumen	
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uniequip, Martinsried
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator 302 nm	Bachofer, Reutlingen

4.1.1.2 Geräte für proteinchemische Arbeiten

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Äkta-Explorer mit	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Box-900	
Detektor UV-900	
Fraktionssammler FRAC-900	
2 Pumpen P-900	
Bio Assay Reader HTS 7000	Perkin Elmer, Waltham, USA
Bio-Dot Microfiltration Apparatur	Bio-Rad, Hercules, USA
Conductivity Meter LF 538, WTW	Gemini BV, Apeldoorn, NL
FPLC-Anlage mit	Pharmacia, Freiburg
Gradienten-Controller LCC-500 Plus	
Detektor UV-M	
Fraktionssammler FRAC-100	
2-Kanalflachbrettschreiber REC-102	
2 Pumpen P500	
Gasphase-Sequenator 473	Applied Biosystems, Weiterstadt
Geltrocknungsrahmen	Carl Roth, Karlsruhe
HPLC-Anlage mit	Sykam GmbH, Ereising
Column Thermo Controller, S 4011	
Linear UVIS-205 Absorbance Detector	
Low Pressure Gradient Mixer, S 8111	
Reagent Organizer, S 7121	
Sample Injector, S 5200	

Solvent Delivery System, S 1121	
Jasco Spektropolarimeter J-715	Jasco, Easton, MD, USA
Pierce Fast Semi-Dry Blotter	Thermo Scientific, Rockford, USA
Tangentialflusssystem Minimate mit Membrankassette 10 kDa	Pall, Dreieich

4.1.1.3 Sonstige Geräte

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Eismaschine AF-10	Scotsman, Frimont, Italien
pH-Meter Inolab pH Level 2	Wiss.-Techn. Werkstätten GmbH, Weilheim
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermostatbad RM 6	Lauda, Lauda-Königshofen
<i>Autoklaven</i>	
Autoklav LTA400	Zirbus, Bad Grund
Vertikaler Standautoklav Typ VE-150	Systec, Wettengel
<i>Photometer</i>	
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer Smart Spec 3000	Bio-Rad, Hercules, USA
Spektralphotometer Uvikon XL	Biotek Instruments, München
<i>Zentrifugen</i>	
Centrikon H-401, Rotor A6.9	Kontron-Hermle, Eching
Centrikon H-401, Rotor A8.20	Kontron-Hermle, Eching
Mikrozentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC-3B, Rotor H-6000A	Sorvall, Thermo Scientific, Schwerte
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, München

4.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Materialien

Alle Chemikalien und Reagenzien, die nicht gesondert aufgeführt werden, wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

4.1.3 Materialien und Reagenzien für mikro- und molekularbiologische Arbeiten

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Reagenzien</i>	
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Rockford, USA
10x BSA	New England Biolabs, Frankfurt
Agarose Broad Range	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Life Technologies, Darmstadt
Antischaum 204	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	BD Biosciences, Bedford, USA
dNTP-Mischung (40 mM)	Roche, Penzberg
DpnI	Stratagene, La Jolla, USA
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific, Rockford, USA
L-Histidin	Life Technologies, Darmstadt
Ligase T4 + Ligasepuffer	Roche, Penzberg
NEB4 Puffer	New England Biolabs, Frankfurt
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Phenol/Chloroform-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe

Restriktionsenzyme (PmeI, SapI, XbaI, XhoI, BspHI)	New England Biolabs, Frankfurt
Yeast Nitrogen Base without amino acids (YNB)	BD Biosciences, Bedford, USA
Zeocin	Life Technologies, Darmstadt
<i>Materialien</i>	
Erlenmeyerkolben mit Schikanen	Nalgene, Rockford, USA
Kryoröhrchen	Thermo Scientific, Rockford, USA
Universal Elektroporationsküvette, 2 mm	Eurogentec, Köln
<i>Kits</i>	
MinElute Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Maxi- bzw. Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA

4.1.4 Materialien und Reagenzien für proteinchemische Arbeiten

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
1-Step Ultra-TMB Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA
ABTS Substrat	Roche, Penzberg
AminoLink Coupling Resin	Thermo Scientific, Rockford, USA
Benzamidin-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Bio Trace PVDF-Transfer Membran 0,45 µm	Pall, Dreieich
DryEase Mini-Gel Drying System	Life Technologies, Darmstadt
Endoglycosidase EndoH _f mit Puffer G5	New England Biolabs, Frankfurt
Filtereinheit FP 30/0,2 CA-S	Whatman, Dassel
Filterpapier 1,2 – 1,5 mm	Whatman, Dassel
Fractogel EMD SO ₃ ⁻ (M)	Merck, Darmstadt
Gel Code Blue Safe Protein Stain	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gel Filtration LMW + HMW Calibration Kit	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Heparin H0777, H8537	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Kodak processing chemicals for autoradiography films GBX fixer/replenisher	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leersäule 5 ml und 10 ml	Mobitec, Göttingen
Macrosep Centrifugal Devices 3 und 10 kDa Omega	VWR, Darmstadt
Magic Mark XP Western Protein Standard	Life Technologies, Darmstadt
MaxiSorb 96-well Platte mit Flachboden, transparent	VWR, Darmstadt
Micro BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, USA
Mikrotiterplatte, 96 well, transparent	Corning, NY, USA
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Peroxidase Substrate Kit DAB, SK-4100	Vector Lab Inc, Burlingame, USA
Pierce Blue Protein Molecular Weight	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Protran BA 85 Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Spectra/Por 1 Dialyseschlauch MWCO 6-8.000	Carl Roth, Karlsruhe
Spectra/Por 3 Dialyseschlauch MWCO 3.500	Carl Roth, Karlsruhe
Spectra/Por 7 Dialysemembran MWCO 10.000	Carl Roth, Karlsruhe
Superose 12 10/300 GL	GE Healthcare, Frankfurt a. M.
Tris-Glycin-Gradientengele 4-20 %, 12 Bahnen	Anamed, Groß-Bieberau
TSKgel Heparin-5PW, rostfreier Stahl, 7,5 mm x 7,5 cm	Tosoh, Tokio, Japan
Zellophanblätter	Life Technologies, Darmstadt

4.1.5 Reagenzien für enzymkinetische Methoden

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Diverse fluorogene Substrate	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Mikrotiterplatte, 96 well, schwarz, flacher Boden	Corning, NY, USA
TFA, 91701, >99,5 %	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Proteasen</i>	
Cathepsin C	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim aR
Cathepsin G	Biocentrum, Krakau, Polen
Cathepsin V	R&D Systems, Minneapolis, USA
Elastase	Biocentrum, Krakau, Polen
Faktor Xa	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim aR
Kallikrein	Bayer, Leverkusen
Plasmin	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim aR
rekombinante Tryptase $\beta_{1a,3}$ -Monomer/Tetramer	AG Sommerhoff
t-PA	AG Magdolen, TU München
Urokinase	Cytoshop, Rehovot, Israel
<i>Inhibitoren</i>	
1,10-Phenanthrolin	Serva, Heidelberg
Antipain	Bachem, Bubendorf, Schweiz
APC-366	Santa Cruz, Dallas, USA
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Arg15-Aprotinin	AG Fritz
Ecotin	Biocentrum, Krakau, Polen
Gabexat mesylat	R&D Systems, Minneapolis, USA
rLDTI	Novartis, Basel, Schweiz
Tryptase β -Inhibitoren	Altana, Konstanz
eigene Tryptase β -Inhibitoren	N. Schaschke, Hochschule Aalen
α 1-Proteinaseinhibitor	Abcam, Cambridge, UK
<i>Protein- und Peptidsubstrate</i>	
CGRP, human, H-1470	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Fibrinogen	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Kininogen	Haemochrom, Essen
PHM-27, human, H-6355	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Prothrombin	Biocentrum, Krakau, Polen
pro-uPA	AG Magdolen, TU München
VIP, human, H-3775	Bachem, Bubendorf, Schweiz

4.1.6 Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Antigen</i>	<i>Klonalität</i>	<i>Spezies</i>	<i>Hersteller</i>
111-035-045	Kaninchen IgG	poly	Ziege	Dianova, Hamburg
115-035-062	Maus IgG	poly	Ziege	Dianova, Hamburg
305-035-008	Ziege IgG	poly	Kaninchen	Dianova, Hamburg
7076	Maus IgG	poly	Pferd	Cell Signalling, Leiden, Holland
9E10	c-myc	mono	Maus	Santa Cruz, Dallas, USA
A5795	Ratte IgG	poly	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AA1	huTryptase $\alpha + \beta$	mono	Maus	MBL, Woburn, USA
AF1667	TPSG1	poly	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, USA
H9	huTryptase $\alpha + \beta$	mono	Maus	Santa Cruz, Dallas, USA
His ₆ -HRP	His ₆ -Tag	mono	Maus	Roche, Penzberg
K11	huTryptase β	poly	Kaninchen	AG Sommerhoff
MAB1222/G3	TPSAB1	mono	Maus	EMD Millipore, Darmstadt
MAB1667	TPSG1	mono	Ratte	R&D Systems, Minneapolis, USA
sTE1	huTryptase β	poly	Schaf	AG Sommerhoff
TGII/IV	rhTryptase γ	poly	Kaninchen	AG Sommerhoff
TPSD1	huTryptase δ	poly	Kaninchen	Abgent, San Diego, USA

4.1.7 ELISA-Kits

Bezeichnung	Zielprotein	Hersteller
SEB070Hu	Tryptase (TPS)	Wuhan USCN Business Co., Hubei, China
E10501H	Tryptase γ (TPSG1)	Wuhan USCN Business Co., Hubei, China
CSB-E09012h	Tryptase γ (TPSG1)	Cusabio Life Science, Hubei, China

4.1.8 Pufferlösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x Tris-Glycin-Laufpuffer	0,25 M Tris-Base, 2,5 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,3 – 8,5
Basalsalz Medium	2 % ortho-Phosphorsäure, 0,09 % CaSO_4 , 1,8 % K_2SO_4 , 1,49 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,41 % KOH, 4 % Glycerin, 0,45 % Spurenelementlösung (steril)
<i>Benzamidin-Affinitätschromatographie</i>	
Puffer A	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 1 M NaCl, pH 7,5
Puffer B	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 1 M NaCl, 250 mM Benzamidin, pH 7,5
Beschichtungspuffer Sandwich-ELISA	15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9,6
Beschichtungspuffer indirekter ELISA	0,1 M NaOAc, 0,1 M NaCl, pH 5,5
Blockierungslösung Immunblot	1x PBST, 5 % Milchpulver (w/v)
Blockierungspuffer Sandwich-ELISA	PBST, 5 % BSA (w/v)
BM_-Medium	0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 (steril) 1,34 % YNB (steril), $4 \cdot 10^{-5}$ % Biotin (steril)
BMG-Medium	BM_-Medium + 1 % Glycerin (v/v) (steril)
BMM-Medium	BM_-Medium + 1 % Methanol (v/v) (steril)
BM_Y-Medium	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 1,34 % YNB (v/v) (steril), 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 (steril), $4 \cdot 10^{-5}$ % Biotin (v/v) (steril),
BMGY-Medium	BM_Y-Medium + 1 % Glycerin (v/v) (steril)
BMMY-Medium	BM_Y-Medium + 1 % Methanol
Coomassie-Färbelösung	10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 0,1 % Coomassie
Dialysepuffer 1 für Immunisierung	50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5
Dialysepuffer 2 für Immunisierung	50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 10 % Glycerin
Gelfiltration Puffer A	50 mM MES, 1 M NaCl, 0,01 % NaN_3 , pH 6
Gelfiltration Puffer B	PBS, 1 M NaCl
<i>Heparin-Affinitätschromatographie</i>	
Puffer A	50 mM Tris, 0,1 M NaCl, pH 7,5
Puffer B	50 mM Tris, 2 M NaCl, pH 7,5
Kaliumphosphatpuffer	1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6,0
<i>Kationenaustauschchromatographie</i>	
Puffer A	50 mM MES, pH 5,75
Puffer B	50 mM MES, 2 M NaCl, pH 5,75
Konservierungslösung für SDS-Gele	20 % Ethanol, 5 % Glycerin
Lagerungspuffer für Tryptase γ -Zymogen	50 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 6,0
Lagerungspuffer rhTryptase γ	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 1 M NaCl, pH 5,0
LB low salt-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl
LB-Agar	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 2% Agar

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl
<i>Ni-NTA-Affinitätschromatographie für rhTryptase γ</i>	
Puffer A	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,3 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 7,5
Puffer B	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,3 M NaCl, 50, 100 und 250 mM Imidazol, pH 7,5
<i>Ni-NTA-Affinitätschromatographie für Tryptase γ-Zymogen</i>	
Puffer A	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,3 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8,0
Puffer A2	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,3 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
Puffer B	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,3 M NaCl, 50, 100 und 250 mM Imidazol, pH 8,0
NZY Medium	1 % NZ amin (casein hydrolysate), 5 % Hefeextrakt, 5 % NaCl, pH 7,5, autoklavieren
PBS	12,5 M MgCl ₂ , 12,5 M MgSO ₄ , 4 % Glucose
PBST	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
pH-Testpuffer (PTP) 1a-c	PBS + 0,5 % Tween-20
PTP 2a-c	50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15, 0,5 bzw. 1 M NaCl, pH 11-12, \pm 0,1 μ g/ml Heparin
PTP 3a-c	50 mM Glycin/NaOH, 0,15, 0,5 bzw. 1 M NaCl, pH 9,5-10,5, \pm 0,1 μ g/ml Heparin
PTP 4a-c	50 mM Tris/HCl, 0,15, 0,5 bzw. 1 M NaCl, pH 7-9, \pm 0,1 μ g/ml Heparin
PTP 5a-c	50 mM MES/NaOH, 0,15, 0,5 bzw. 1 M NaCl, pH 5,5-6,5, \pm 0,1 μ g/ml Heparin
<i>Puffer für AminoLink Resin</i>	
Cyanoborhydridlösung	50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7,2
Elutionspuffer	1 M NaOH, 5 M NaCNBH ₃
Kopplungspuffer	50 mM Glycin/HCl, pH 2,5
Lagerungspuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7,2
Neutralisierungspuffer	PBS + 0,05 % NaN ₃
Quenching Puffer	1 M Tris/Glycin, pH 9,0
Waschlösung	1 M Tris/HCl, pH 7,4
<i>Puffer für CD-Spektroskopie</i>	
Puffer CD-B	1 M NaCl
Puffer CD-G	20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,6, 50 μ g/ml Heparin
SOC-Medium	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Spurenelementlösung	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl (steril), 10 mM MgCl ₂ (steril), 1 M Glucose (steril)
Substratlösung indirekter ELISA	0,6 % CuSO ₄ , 0,008 % NaI, 0,3 % MnSO ₄ , 2 % ZnCl ₂ , 0,02 % Na ₂ MoO ₄ , 0,002 % H ₃ Bo ₃ , 0,05 % CoCl ₂ , 6,5 % FeSO ₄ , 0,02 % Biotin, 0,5 % H ₂ SO ₄ , steril filtrieren
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer, 50x	0,1 M Citronensäure, 0,1 M Na ₂ HPO ₄ , pH 4,5, 2 % ABTS, 0,6 % H ₂ O ₂
Tris-Glycin-Probenpuffer, 4x	2 M Tris Base, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA, pH 8,5
Tryptase-Testpuffer (TTP)	0,4 M Tris-HCl, 20 % Glycerin, 8 % SDS, Bromphenolblau, pH 6,8
Tryptase-Verdünnungspuffer (TVP)	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6, 0,01 % Triton X-100, 0,01 % NaN ₃ , 0,2 μ m Rotrandfilter
Vorlageflasche Antischaum	10 mM MES, 1 M NaCl, 0,01 % Azid, pH 6,1, 0,2 μ m Rotrandfilter, 0,01 % Triton X-100,
Vorlageflasche Base	1 % Antischaum
Vorlageflasche Glycerin	14 % NH ₄ OH
	50 % Glycerin, 1,25 % Spurenelementlösung (steril)

Vorlageflasche Methanol	100 % Methanol, 1,25 % Spurenelementlösung (steril)
Vorlageflasche Säure	6 % ortho-Phosphorsäure
YPD-Agar	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Agar, 2 % Dextrose
YPD-Medium	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Dextrose

4.1.9 Bakterien- und Hefestämme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> OneShot TOP10F'	Life Technologies, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Life Technologies, Darmstadt
<i>Pichia pastoris</i> KM71	Life Technologies, Darmstadt
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168	Life Technologies, Darmstadt
<i>Pichia pastoris</i> X33	Life Technologies, Darmstadt

4.1.10 Plasmide

Die verwendeten pPICZα- und pGAPZα-Plasmide enthalten den pUC *origin*, der die Replikation und Stabilität des Plasmids in *E. coli* erlaubt und das Zeocin-Resistenzgen, dessen Expression durch die Promotoren P_{TEF1} und P_{EM7} in *Pichia pastoris* bzw. *E. coli* kontrolliert wird. Die Plasmide unterscheiden sich in den Promotoren *upstream* (5') der *Multiple Cloning Site*, mit dem Methanol-induzierbaren AOX1-Promotor im pPICZα-Vektor und dem konstitutiv aktiven GAP-Promotor im pGAPZα-Vektor. Die Integration der Plasmide in das *Pichia*-Genom erfolgt über homologe Rekombination am AOX1- bzw. GAP-Lokus.

4.1.10.1 pPICZαA

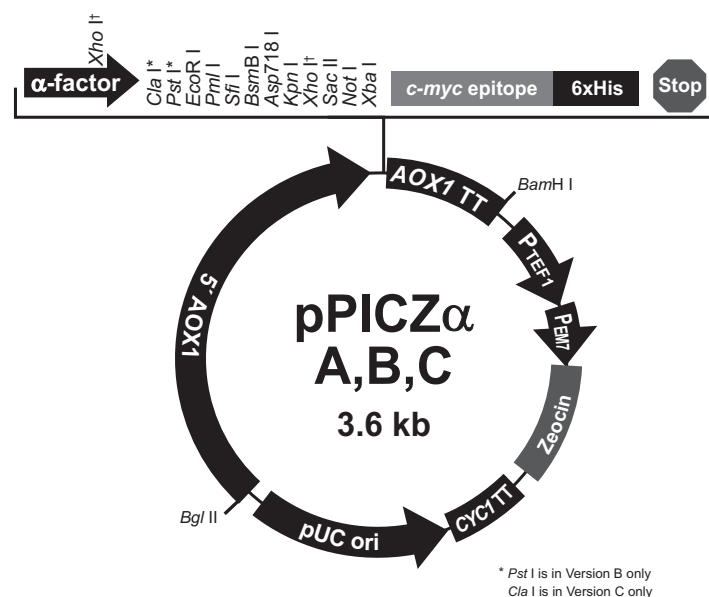


Abb. 4.1-1: Vektorkarte des Plasmids pPICZαA. Darstellung der Gensequenzen der Promotorregion P_{AOX1}, der multiplen Klonierungsstelle mit Restriktionsschnittstellen und Antibiotikaresistenz für Zeocin (Life Technologies).

4.1.10.2 pGAPZαA

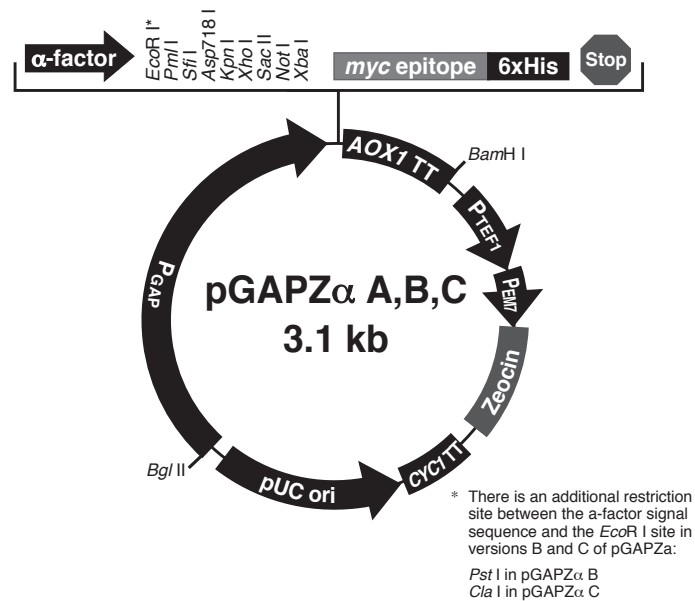


Abb. 4.1-2: Vektorkarte des Plasmids pGAPZαA. Schematische Darstellung der Genabschnitte des Promotors P_{GAP} , der multiplen Klonierungsstelle mit Restriktionsschnittstellen und der Zeocinresistenz (Life Technologies).

4.1.11 Konstrukte

Die initial verwendeten Konstrukte stammen aus Vorarbeiten von U. Sauer [96]. Sie sind in der *Multiple Cloning Site* des pPICZαA-Vektors kloniert. Ihre Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (s. a. Abb. 5.2-1):

Konstrukt	Abkürzung	Beschreibung	Quelle
Tryptase γ Zymogen ΔC	proTyΔC	Fragment R20-R281 N-Terminus: α-Faktor-Signalpeptid, KEX2-Schnittstelle C-Terminus: c-myc-His ₆ -Tag	U. Sauer, K113
Tryptase γ reife Form ΔC	rTyΔC	Fragment I38-R281 N-Terminus: α-Faktor-Signalpeptid, KEX2-Schnittstelle C-Terminus: c-myc-His ₆ -Tag	U. Sauer, K115

4.1.12 Primer

4.1.12.1 Primer für die Sequenzierung

Tab. 4.1-1: Primer für die Sequenzierung von Konstrukten in der Multiple Cloning Site der Vektoren pPICZαA und pGAPZαA.

Name	Sequenz	Vektor	Hersteller
5'AOX1	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC	pPICZαA; forward	Eurofins, Ebersberg
3'AOX1	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC	pPICZα, pGAPZα; reverse	
alpha-f	TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC	pGAPZα; forward	

4.1.12.2 Primer für die Mutagenese

Tab. 4.1-2: Primer für die zielgerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren.

<i>Ziel</i>	<i>Sense (5' → 3')</i>	<i>Antisense (5' → 3')</i>	<i>Hersteller</i>
C145A	GATCCTGCCCCGTCGCCCTCCCGG AGGCC	GGCCTCCGGGAGGGCGACGGG CAGGATC	Metabion, Planegg
C154A	GGCTCAGATGACTTCGCCCCCTGG GATCCGGTG	CACCGGATCCCAGGGGCGAAGT CATCTGAGGC	Metabion, Planegg
S222A	GCCAGGACGACGCCGGGGGGGCC T	AGGCCCCCGGCGTCGTCCTG GC	Metabion, Planegg

4.1.13 Software-Programme und Datenbanken

<i>Analyse/Methode</i>	<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
CD-Spektroskopie	K2D3 K2D2	[97], URL: k2d3.ogic.ca [98], URL: k2d2.ogic.ca
Densitometrie	ImageJ Vers. 1.47v	Wayne Rasband, NIH, USA
Enzymkinetik	pro Fit Vers. 6.2.16 GraphPad Prism Vers. 5	QuantumSoft, Uetikon am See, CH GraphPad Software, La Jolla, USA
Gen- und Protein- Referenzsequenzen	NCBI Datenbank	National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine
Glykosylierungsstellen	NetNGlyc, Expasy	Swiss Institut of Bioinformatics
Isoelektrischer Punkt (pI)	ProtParam, Expasy	Swiss Institut of Bioinformatics
Literatur	EndNote Vers. X7	Thomson Reuters
Modellierung der rhTryptase γ	Swiss-Model	Swiss Institut of Bioinformatics
Mutagenese-Primer	QuikChange Primer Design	Strataclone, La Jolla, USA
Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	MacVector Vers. 12.5	MacVector Inc., Cambridge, GB
Proteasen Datenbank	Merops	[99]
Templates zur Modellierung	RCSB PDB	National Science Foundation, National Institutes of Health, US Department of Energy
Überlagerung von Modellen	PyMol Vers. 1.8	PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.
Steuerung des Bioreaktors	Iris Vers. 5	Infors-HT, Bottmingen

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Zielgerichtete Mutagenese

Für die zielgerichtete Mutagenese einzelner Aminosäuren in den Tryptase γ -Konstrukten wurde das *QuikChange Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet und entsprechend dem Protokoll vorgegangen. Zunächst wurden die Primer (s. Tab. 4.1-2) mit Hilfe des *QuikChange Primer Design*-Programms ausgewählt. Für eine PCR-Reaktion wurden sie in einer Endmenge von je 2,5 ng mit dem jeweiligen Plasmid pPICZ α A- bzw. pGAPZ α A-rTy Δ C (Vektorkarten s. Abb. 4.1-1 und Abb. 4.1-2) in einer Endmenge von 1 ng, einer dNTP-Mischung (Endkonzentration 1 mM) und der Pfu Turbo DNA Polymerase (2,5 U) angesetzt. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
1	95	30
	95	30
16	55	60
	68	300
1	4	unendlich

Um das eingesetzte, methylierte und unmutierte Plasmid abzubauen, wurde der Ansatz anschließend eine Stunde bei 37°C mit DpnI (10 U) inkubiert. Für die Transformation der superkompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden 50 μ l der Zellsuspension mit 2 μ l des Ansatzes versetzt und 30 min auf Eis ruhen gelassen. Danach folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s und eine Inkubation bei 4°C für 2 min. Schließlich wurden die Zellsuspension mit 0,5 ml NZY-Medium versetzt, eine Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert, auf LB-Zeocin-Platten (25 μ g/ml Zeocin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Für die Herstellung der pPICZ α A- und pGAPZ α A-rTy Δ C-C145A/C154A-Konstrukte wurden zuerst die entsprechenden C154A-Konstrukte generiert und anschließend für die zielgerichtete Mutagenese mit dem C145A-Primerpaar verwendet (s. Tab. 4.1-2).

4.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung von 1,5 %-igen (w/v) Agarosegelen wurde Agarose der entsprechenden Menge in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle (900 W, 1 min) gelöst. Diese Lösung wurde in die Gelkammer in Anwesenheit eines Probenkamms gegossen und mit Ethidiumbromid (0,05 % Endkonz.) versetzt. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Laufpuffer (1x TAE) zugegeben und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 6-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt, parallel zum Marker in die Geltaschen gefüllt und mit 100 V etwa 20 - 40 min elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe des Gel Imagers wurden die Banden im UV-Licht mit 302 nm sichtbar.

gemacht und fotografiert. Bei Gelen, die der präparativen Aufreinigung der DNA dienten, wurde die UV-Exposition während des Ausschneidens der Gelstücke so gering wie möglich gehalten.

4.2.1.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurde entsprechend dem Protokoll des MinElute Gelextraktionskits der Firma Qiagen vorgegangen. Dafür wurde das ausgeschnittene Gelstück in der dreifachen Menge Puffer QC 10 min bei 55°C gelöst, anschließend mit einem Gelvolumen Isopropanol vermischt und auf eine MinElute-Säule gebunden. Nach zweimaligem Waschen wurde die DNA mit 30 µl Wasser eluiert.

4.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* für geringe Ausbeuten (ca. 200 ng/µl) und das *QIAprep Spin Maxiprep Kit* für hohe Ausbeuten (ca. 3000 ng/µl) verwendet. Dafür wurden einzelne Kolonien in 3 ml LB-low salt mit Zeocin (25 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die Mini-präparation wurden die Zellen dieses Ansatzes zentrifugiert (9500 x g, 3 min) und entsprechend dem Protokoll des Miniprep Kits weiter behandelt. Um größere Ausbeuten mit Hilfe der Maxipräparation zu erhalten, wurden diese Ansätze in 100 ml LB-low salt-Zeocin überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (6000 x g, 15 min, 4°C) und anschließend nach dem Protokoll des Maxiprep Kits aufbereitet.

4.2.1.5 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung von DNA erfolgte am UV/Vis-Spektralphotometer, das basierend auf dem Lambert-Beer'schen-Gesetz

$$c = \frac{A}{\varepsilon * L}$$

mit A = Absorption bei 260 nm in AU

ε = Extinktionskoeffizient in M⁻¹cm⁻¹

und L = Schichtdicke in cm

die Konzentration doppelsträngiger Nukleinsäuren bestimmt. Dabei wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen und darauf geachtet, dass das Verhältnis der A₂₆₀/A₂₈₀ etwa 1,8 beträgt.

4.2.1.6 Sequenzierung von DNA

Zur DNA-Sequenzierung von Klonierungsprodukten wurden die Plasmide isoliert (s. o.) und in einer Konzentration von 50 - 100 ng/µl in Wasser aufgenommen. Für Konstrukte im pPICZαA-Plasmid wurde das Primerpaar 5'AOX1 und 3'AOX1 und für pGAPZαA-Konstrukte

das Paar alpha-f und 3'AOX1 gewählt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins in Ebersberg vorgenommen.

4.2.1.7 Klonierung in den Vektor pGAPZαA

4.2.1.7.1 Restriktion aus dem Vektor pPICZαA

Für die Umklonierung der Konstrukte pPICZαA-rTyΔC-C145A, pPICZαA-rTyΔC-C154A und pPICZαA-rTyΔC-C145A/C154A in den pGAPZαA-Vektor wurden die Inserts zuerst mittels Restriktion aus dem pPICZαA-Vektor geschnitten. Dafür wurden die Plasmide (3 µg/µl) und der Zielvektor (0,2 µg/µl) nach folgendem Pipettierschema mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI (NEB) eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Reagenz	Volumen [µl]			
	Probe	Kontrolle1	Kontrolle2	Kontrolle Ø
pPICZαA-rTyΔC-wt; -C145A; - C154A; -C145A/C154A (3 µg/µl)	3	3	3	3
XhoI	1	1	-	-
XbaI	0,5	-	0,5	-
NEB4 Puffer	2	2	2	2
10x BSA	2	2	2	2
ddH ₂ O	11,5	12	12,5	13
Gesamtvolumen	20	20	20	20

Reagenz	Volumen [µl]	
	Probe	Kontrolle 1
pGAPZαA (3 µg/µl)	10	5
XhoI	1	-
XbaI	0,5	-
NEB4 Puffer	2	2
10x BSA	2	2
ddH ₂ O	4,5	11
Gesamtvolumen	20	20

Die Ansätze (20 µl) wurden anschließend mit 6-fachem Ladungspuffer (4 µl) versetzt, auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch der Größe nach getrennt. Die Banden bei einer Größe von 746 nt wurden aus dem Gel geschnitten und die DNA-Fragmente wie in 4.2.1.2 beschrieben isoliert.

4.2.1.7.2 Ligation der Inserts mit dem pGAPZαA-Vektor

Nach Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration (s. 4.2.1.5) der Inserts (746 nt) und des Vektors pGAPZαA (3060 nt) wurden diese für die Ligation nach folgendem Ansatz mit der Ligase T4 (Roche) eine Stunde bei 16°C inkubiert.

Reagenz	Volumen [μ l]	
	Probe	Kontrolle 1
pGAPZ α A (20 ng/ μ l)	1	1
Insert (14 ng/ μ l)	1	1
T4 Ligase	1	-
Ligasepuffer	1	1
ddH ₂ O	6	7
Gesamtvolumen	10	10

4.2.1.7.3 Transformation von *E. coli* One Shot TOP10F'

Die Ligationsansätze wurden für die Transformation der elektrokompenten *E. coli* One Shot TOP10F'-Zellen verwendet. Dafür wurde wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben vorgegangen.

4.2.1.7.4 Restriktionsanalyse

Um die Ligation der Inserts mit dem Zielvektor pGAPZ α A zu verifizieren, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dafür wurden zuerst die Plasmide aus den *E. coli*-Zellen isoliert (s. 4.2.1.4), mit den Restriktionsenzymen SapI und XbaI nach folgendem Schema versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Reagenz	Volumen [μ l]
pGAPZ α A-rT γ Δ C-wt; -C145A; - C154A; -C145A/C154A	6,25
SapI	0,6
XbaI	0,6
10x BSA	1,25
NEB4 Puffer	1,25
ddH ₂ O	2,55
Gesamtvolumen	12,5

Anschließend wurden die Ansätze mit 6-fachem Ladungspuffer (2,5 μ l) vermischt und die Restriktionsfragmente mittels Agarosegelelektrophorese (s. 4.2.1.2) getrennt.

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Für die Transformation von superkompetenten XL1-Blue *E. coli*-Zellen wurden die Zellen (50 μ l) mit dem Plasmid (2 μ l) versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und für 45 s auf 42°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis ruhen gelassen, mit vorgewärmten NZY-Medium (0,5 ml) versetzt und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Zeocin (25 μ g/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

4.2.2.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die elektrokompenten TOP10F' *E. coli*-Zellen (80 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz oder Plasmid (2 µl bzw. ca. 5 ng) versetzt und leicht gemischt. Nach kurzer Inkubation (1 - 2 min) wurden die Ansätze in vorgekühlte (-20°C) Elektroporationsküvetten überführt und mit Hilfe des Gene Pulser Xcell Elektroporationssystems (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) elektroporiert. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit vorgewärmtem SOC-Medium (1 ml) versetzt, die Ansätze in Reaktionsgefäße (15 ml) überführt und eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit Zeocin (25 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

4.2.2.3 Transformation von *Pichia pastoris*

Die beschriebene Vorgehensweise für die Transformation von *P. pastoris*-Wirtsstämmen gilt für alle vier verwendeten Wirtsstämme X33, KM71, GS115 und SMD1168.

4.2.2.3.1 Herstellung elektrokompenter *P. pastoris*-Zellen

Um *P. pastoris*-Zellen für die Elektroporation vorzubereiten, wurden die Zellen zuerst bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 1,0 - 1,3 in 250 ml YPD-Medium hochgezogen. Die Kultur wurde zentrifugiert (1600 x g, 10 min, 4°C) und das Pellet in kaltem ddH₂O auf Eis resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (1600 x g, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in eiskaltem Sorbitol (1 M, 20 ml) resuspendiert und zentrifugiert (1600 x g, 10 min, 4°C). Schließlich wurde das Pellet in eiskaltem Sorbitol (1 M, 1 ml) aufgenommen und für die Transformation 80 µl der Zellsuspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt.

4.2.2.3.2 Linearisierung des Vektors

Für die Transformation von *P. pastoris* wurden die Vektoren pPICZαA und pGAPZαA mit dem entsprechenden Insert zunächst linearisiert, um deren Einbau in die genomische DNA der Hefe zu gewährleisten. Dafür wurden die Restriktionsenzyme PmeI, das das Plasmid pPICZαA an zentraler Stelle im AOX1- Promoter schneidet, bzw. das Enzym BspHI gewählt, das seine Erkennungssequenz im GAP-Promoter des pGAPZαA-Vektors hat. Für die Restriktion von 30 µg Plasmid wurden die Ansätze nach folgendem Schema pipettiert und vier Stunden bei 37°C inkubiert:

Reagenz	Volumen [µl]
pPICZαA-rTyΔC-C145A; - C154A; -C145A/C154A (3 µg/µl)	10
PmeI	3
NEB4 Puffer	3
10x BSA	3
ddH ₂ O	11
Gesamtvolumen	30

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [μl]</i>
pGAPZαA-rTγΔC-C145A; - C154A; -C145A/C154A (0,7 μg/μl)	40
BspHI	3
NEB4 Puffer	5
ddH ₂ O	2
Gesamtvolumen	50

Anschließend wurden die Restriktionsenzyme PmeI und BspHI 10 bzw. 20 min durch Hitze (65°C) inaktiviert und das Volumen des Ansatzes durch Zugabe von ddH₂O auf 100 μl erhöht.

4.2.2.3.3 Extraktion und Ethanolfällung des linearisierten Vektors

Zur Aufreinigung der DNA aus proteinreichen Lösungen wurde sie mittels Phenol-/Chloroform-Fällung extrahiert. Dafür wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) versetzt und eine Minute gemischt. Nach Zentrifugation (10.000 x g, 5 min) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Chloroform vermischt und zentrifugiert (10.000 x g, 5 min); dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Für die Fällung der DNA mit Ethanol wurde der Ansatz mit einer Natriumacetatlösung (0,3 M Endkonz.) und einem 2,5-fachen Volumen einer 100 %-igen EthanolLösung versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (15.000 x g, 30 min) wurde das Pellet zweimal mit einer 80 %-igen EthanolLösung (200 μl) gewaschen, zentrifugiert (15.000 x g, 30 min), getrocknet und in ddH₂O (10 μl) aufgenommen.

4.2.2.3.4 Transformation der P. pastoris-Zellen mittels Elektroporation

Für die Transformation der Hefezellen wurde die Zellsuspension in den Elektroporationsküvetten mit dem linearisierten Vektor (15 μg) versetzt, etwa 5 min auf Eis inkubiert und am Gene Pulser Xcell Elektroporationssystem (1,5 kV, 25 μF, 200 Ω) elektroporiert. Die Zellen wurden direkt in eiskaltem Sorbitol (1 M, 1 ml) aufgenommen, eine Stunde ohne Schütteln bei 30°C und nach Zugabe von YPD-Medium (1 ml) weitere drei Stunden inkubiert. Schließlich wurden sie auf YPDS-Agarplatten mit unterschiedlichen Zeocinkkonzentrationen (100, 500 und 1000 μg/ml) ausgestrichen und über zwei Tage bei 30°C bebrütet.

4.2.2.4 Haltung von Stammkulturen

4.2.2.4.1 Stammhaltung von Bakterienkulturen

Für die langfristige Lagerung eines Bakterienstamms wurde dieser auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Einzelne Kolonien wurden in 2 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) kultiviert. Diese wurden mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 20 % versetzt, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

4.2.2.4.2 Stammhaltung von Hefekulturen

Die Hefestämme wurden auf LB-Agarplatten mit Zeocin (100 µg/ml) über zwei Tage bei 30°C angezogen, einzelne Stämme in YPD-Medium (10 ml) angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) kultiviert. Bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 50 - 100$ wurde die Kultur mit Glycerin (Endkonz. von 20 – 25 %) versetzt und in Kryoröhrchen für die langfristige Lagerung bei -80°C aliquotiert.

4.2.3 Rekombinante Expression der Tryptase γ -Formen in *P. pastoris*

4.2.3.1 Testexpression mit den pPICZ α A-Stämmen im 10 ml-Maßstab

Für Testexpressionen und die Auswahl geeigneter Expressionsstämme wurde die Expression im 10 ml-Maßstab gewählt. Dafür wurden 10 ml BMGY-Medium mit der entsprechenden Glycerinkultur oder einer Kolonie eines Verdünnungssaustriches angeimpft und die Kultur ein bis zwei Tage unter Schütteln bei 30°C hochgezogen. Bei einer OD_{600} von 2,5 wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 1500 x g) und in methanolhaltigem (1 %) BMMY-Medium (10 ml) resuspendiert. Unter täglicher Methanolzugabe (Endkonz. 1 %) wurden die Kulturen über drei bis fünf Tage kultiviert.

4.2.3.2 Kultivierung der pPICZ α A-Expressionsstämme im Schüttelkolben

Zur rekombinanten Expression im Schüttelkolben wurde der pPICZ α A-Stamm zuerst in 10 ml YPD-Medium über Nacht bei 30°C angezogen. Anschließend wurden mit der Kultur 500 ml BMGY-Medium in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen angeimpft und über Nacht bei 30°C bebrütet. Um die Kultur in methanolhaltiges Medium zu überführen, wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 1500 x g, 4°C) und in BMMY-Medium resuspendiert, sodass ein Nassgewicht von 3 g/l (ca. $OD_{600} = 3$) erreicht wurde. Die Zellen wurden anschließend über drei bis fünf Tage durch tägliche Methanolzugabe (Endkonz. 1 %) bei 30°C kultiviert.

Bei der Kultivierung der *P. pastoris*-Stämme GS115, KM71 und SMD1168 wurden zusätzlich 0,004 % Histidin (Endkonz.) zu dem Medium hinzugefügt.

4.2.3.3 Kultivierung der pPICZ α A-Expressionsstämme im Bioreaktor

Die Fermentation von *P. pastoris*-Expressionsstämmen im Bioreaktor Labfors 4 erlaubt die Kultivierung der Hefe unter sterilen und kontrollierten Bedingungen. Dieser Bioreaktor besteht aus einem Kulturgefäß (5 l) und einer Regeleinheit, die manuell oder auch mit Hilfe der Software Iris 5 bedient wird und Parameter wie den Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Temperatur und Schaumbildung regeln kann (Abb. 4.2-1).

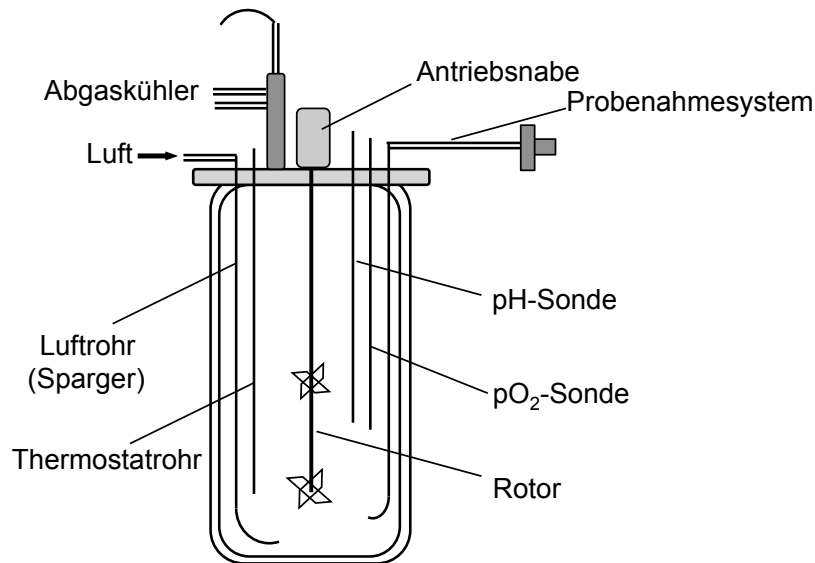


Abb. 4.2-1: Schematische Darstellung des Bioreaktors Labfors 4.

4.2.3.3.1 Anzucht der Vorkultur

Für die rekombinante Expression wurden zunächst 10 ml YPD-Medium mit einer Kolonie eines Verdünnungsausstrichs oder einer Glycerinkultur angeimpft und die Kultur über Nacht bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) hochgezogen. Diese wurde für die Expression in Vollmedium in 500 ml BMGY-Vollmedium bzw. für die Expression in Minimalmedium in 500 ml BMG-Minimalmedium in einen Erlenmeyerkolben mit Schikanen überführt und 24 h bzw. 48 h bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) bis zu einem Nassgewicht von ca. 30 g/l kultiviert.

4.2.3.3.2 Vorbereitung des Bioreaktors

Vor der rekombinanten Expression wurde der Bioreaktor sterilisiert. Dazu wurde das Kulturgefäß mit dem Medium (Vollmedium BM_Y (2700 ml) bzw. Basalsalz-Medium (3000 ml)) sowie dem Luftrohr, der Antriebsnabe, dem Probennahmesystem, den Pumpenköpfen, der pO₂- und der kalibrierten pH-Sonde für 30 min bei 121°C sterilisiert (Standautoklav Typ VE-150). Nach dem Abkühlen des Mediums wurde dem Vollmedium YNB, Glycerin, Kaliumphosphatpuffer und Biotin bzw. dem Basalsalz-Medium die Spurenelementlösung (21,75 ml) steril hinzugefügt, der Temperatursensor in das Blindrohr eingeführt und die pO₂-Sonde 6 h polarisiert und unter starker Luftzufuhr kalibriert. Anschließend wurden die Vorlageflaschen des Antischaums, der Säure, der Base und des Glycerins angeschlossen und der pH-Wert auf 5,5 eingestellt (Abb. 4.2-1).

4.2.3.3.3 Fermentation der pPICZαA-Expressionsstämme

Zunächst wurde die Vorkultur zu dem Medium steril hinzugefügt, sodass ein Nassgewicht von ca. 3,0 g/l erreicht wird. Die Fermentation unterteilt sich in drei Phasen und ist unabhängig vom eingesetzten Expressionsmedium. In der ersten Phase, der Glycerin-*Batch*-Phase (1 % Glycerin), wird innerhalb von 24 h Zellmasse bis zu einem Nassgewicht von ca.

100 g/l generiert. In der Glycerin-Fütterungsphase, der zweiten Stufe, wird durch weitere Glycerinzugabe von ca. 1 %/h*I (bzw. 8 ml/h*I) die Zellmasse auf ein Nassgewicht von ca. 300 g/l erhöht. Nach Erreichen einer optimalen Zellmasse wird durch steigende Zugabe von Methanol mit anfangs <0,4 %/h*I (bzw. 3 ml/h*I) bis zu 3 %/h*I (bzw. 30 ml/h*I) die rekombinante Expression der Zielproteine induziert.

Während der Fermentation wurde der pO_2 -Wert bei 32 - 35 % und die Temperatur bei 28°C konstant gehalten. Es wurden alle 12 - 24 h Proben entnommen und zentrifugiert (1500 x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde für die Bestimmung des Nassgewichts verwendet und von den Überständen wurden Proben für den Immunblot (4.2.5.2) angefertigt. Außerdem wurden von den Überständen Proben für die Messung der enzymatischen Aktivität entnommen.

4.2.3.3.4 Zellernte

Nach Beendigung der Fermentation wurde die Hefekultur über das Probenahmesystem aus dem Kulturgefäß geerntet und anschließend zentrifugiert (2600 x g, Sorvall H-6000A Rotor, 3 - 6 h, 4°C). Der Hefeüberstand wurde bis zur Isolierung der rekombinanten Proteine bei 4°C gelagert.

4.2.3.4 Kultivierung der pGAPZαA-Expressionsstämme

Die pGAPZαA-Expressionsstämme wurden sowohl für die Testexpression im 10 ml-Maßstab als auch für die Expression im Schüttelkolben über drei Tage bei 30°C in BMGY-Medium kultiviert.

4.2.4 Chromatographische Methoden

4.2.4.1 Isolierung der rhTryptase γ

4.2.4.1.1 Metall-Affinitätschromatographie

Zur Isolierung der rhTryptase γ über den C-terminalen His₆-Tag wurde die Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet. Dafür wurden nach der Fermentation 50 ml des Hefeüberstands mit NaCl (300 mM) und Imidazol (5 mM) versetzt, der pH auf 7,5 eingestellt und die Lösung mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine offene Ni-NTA-Agarose (1,5 ml; 0,85 x 0,75 cm, h x r) bei Raumtemperatur aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mit dem Puffer A von der Säule gewaschen, bis eine $A_{280} < 0,1$ erreicht wurde. Schließlich wurden die gebundenen Proteine mit steigender Imidazolkonzentration (50, 100 und 250 mM) von der Säule eluiert. Von den einzelnen Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm und zum Teil auch die enzymatische Aktivität bestimmt.

Für die Untersuchung der C-terminalen Prozessierung wurden Elutionsfraktionen mit hohen Absorptionswerten und ohne nachweisbarer enzymatischer Aktivität ausgewählt und mittels SDS-PAGE und N-terminaler Sequenzbestimmung analysiert.

4.2.4.1.2 Dialyse

Für die Entfernung von Zellresten wurde der Hefeüberstand zentrifugiert (14.000 rpm, Kontron Rotor 8.2, 20 min, 4°C) und filtriert (0,22 µm). Durch Dialyse wurde anschließend der pH auf 5,75 eingestellt und kleine basische Peptide entfernt. Dafür wurde das Filtrat in Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgrenze von 6 - 8 kDa (Spectra/Por 1; ca. 1 l) gefüllt und einmal 2 h und einmal über Nacht bei 4°C gegen den Puffer A (4 l) der Kationenaustauschchromatographie in einem Verhältnis 1:4 dialysiert.

4.2.4.1.3 Kationenaustauschchromatographie

Nach der Dialyse wurde zur Isolierung der rhTryptase γ direkt mit der Kationenaustauschchromatographie (Fractogel EMD SO_3^- (M) ca. 90 ml, 4,5 x 2,5 cm, h x r) fortgefahren. Dafür wurde das Dialysat (ca. 2500 - 3000 ml) bei 4°C mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf für die spätere Analyse fraktioniert (500 ml) aufbewahrt. Anschließend wurden mit dem Puffer A ungebundene Proteine von der Säule gewaschen (5 - 10 CV), bis eine Absorption $A_{280} < 0,1$ erreicht wurde. Die Zielproteine wurden schließlich mit dem Puffer B von der Säule eluiert und fraktioniert (25 ml) gesammelt. Von allen Fraktionen wurde jeweils die Absorption bei 280 nm, die Leitfähigkeit und die enzymatische Aktivität bestimmt.

4.2.4.1.4 Benzamidin-Affinitätschromatographie

Das Eluat der Kationenaustauschchromatographie (ca. 20 ml bzw. ca. $5 \cdot 10^7$ U) wurde mit dem Puffer A der Benzamidin-Affinitätschromatographie im Verhältnis 5:1 verdünnt und der pH auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine offene Benzamidin-Sepharose (10ml, 4,5 x 0,85 cm, h x r) aufgetragen und der Durchlauf fraktioniert gesammelt (5 ml). Ungebundene Proteine wurden mit dem Puffer A von der Säule gewaschen, bis eine Absorption $A_{280} < 0,1$ erreicht wurde. Die rhTryptase γ wurde schließlich mit dem Puffer B von der Säule eluiert und in Fraktionen (2 ml) gesammelt. Zur Bestimmung der Fraktionen mit der höchsten Ausbeute wurde von allen Fraktionen die Absorption bei 280 nm und die enzymatische Aktivität bestimmt.

Die Fraktionen mit den höchsten Ausbeuten bzw. der höchsten enzymatischen Aktivität wurden vereinigt und in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa gegen den Lagerungspuffer (im Verhältnis 1:1000) dialysiert, bis die Benzamidinkonzentration rechnerisch im femtomolaren Bereich war. Zuletzt wurde über eine 3 kDa-Membran (MacroSep, Omega) mittels Ultrafiltration die rhTryptase γ weiter aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

4.2.4.2 Isolierung des Zymogens der Tryptase γ

4.2.4.2.1 Metall-Affinitätschromatographie

Nach der Zellernte wurde der Hefeüberstand (ca. 3000 ml) zunächst über das Tangentialflusssystem Minisette (Pall) mit einer Membrankassette von 10 kDa Ausschlussgröße um den Faktor fünf konzentriert. Dieses Konzentrat (ca. 570 ml) wurde mit einem Drittel des Volumens (200 ml) mit Puffer A der Ni-NTA-Affinitätschromatographie versetzt und der pH auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min bei Raumtemperatur auf eine Ni-NTA-Agarose (10 ml; 5,7 x 0,75 cm, h x r) aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mit Puffer A und Puffer A2 von der Säule gewaschen, bis eine Absorption bei 280 nm $< 0,1$ erreicht wurde. Anschließend wurden gebundene Proteine mit steigender Imidazolkonzentration in Puffer B (50, 100 und 250 mM) von der Säule eluiert.

Die Fraktionen mit den höchsten Absorptionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um die Anwesenheit des Zielproteins und die Reinheit zu kontrollieren. Ausgewählte Fraktionen wurden anschließend vereinigt, über eine 10 kDa Filtermembran (MacroSep, Omega) konzentriert und schließlich gegen einen Lagerungspuffer viermal im Verhältnis 1:250 dialysiert (10 kDa, Spectra/Por), um die Imidazolkonzentration rechnerisch auf einen picomolaren Wert zu senken. Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

4.2.5 Proteinchemische Methoden

4.2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde mittels Micro BCA Protein Assay Kit bestimmt, das nach den Herstellerangaben durchgeführt wurde. Die Proben wurden dafür in entsprechenden Verdünnungen (meist 1:5 - 1:100) in der Mikrotiterplatte vorgelegt, mit dem gleichen Volumen an Substratlösung versetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 550 nm gemessen und die Konzentrationen der Proben anhand einer BSA-Standardreihe ermittelt.

Zur photometrischen Proteinbestimmung wurde die Proteinlösung (0,5 - 1 ml) in eine Quartzküvette gefüllt und die Absorption bei 280 nm Wellenlänge am Photometer Smart Spec 3000 gemessen. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Für die Bestimmung der Antikörperlösungen wurde der Extinktionskoeffizient von $1,36 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für IgG verwendet (ProtParam, Expasy).

4.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteingemischen mittels SDS-PAGE wurden Tris/Glycin-Gradientengele 4-20 % verwendet. Dafür wurden die Proben (10 μl) mit Tris/Glycin-Proben-

puffer – für reduzierende Bedingungen mit 0,1 M DTT – versetzt und die Proteine 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben und der Proteinmarker, Pierce Blue Protein Molecular Weight oder Magic Mark XP Western Protein Standard (je 5µl), auf das Gel aufgetragen und bei 125 V innerhalb von 1,5 Stunden elektrophoretisch getrennt.

4.2.5.2.1 *Proteinfällung mit Trichloressigsäure*

Zur Aufkonzentrierung von Proteinen in einer Probe wurde diese mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 14.000 x g) der Probe wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit Aceton gewaschen, in Tris/Glycin-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C gekocht.

4.2.5.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden mit Hilfe der Gel Code Blue Safe Protein Stain-Lösung (Thermo Scientific) visualisiert. Dazu wurde das Gel zweimal je 10 min mit Wasser gewaschen, eine Stunde in der Färbelösung (40 ml) inkubiert und anschließend mehrmals mit Wasser entfärbt, bis der Hintergrund klar wurde.

Für die Langzeitlagerung von SDS-Gelen wurde das Gel in Konservierungslösung 15 min bei Raumtemperatur äquilibriert, zwischen zwei Zellophanblättern eingespannt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

4.2.5.4 Proteinnachweis mittels Immunblot-Analyse

4.2.5.4.1 *Proteintransfer auf PVDF-Membranen*

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte unter Verwendung der Fast Semi-Dry-Methode. Dafür wurde das Gel nach der Elektrophorese 10 min in ddH₂O gewaschen und 10 min in Pierce Fast Semi-Dry Transfer Buffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol (100 %) befeuchtet, kurz mit ddH₂O gewaschen und in Fast Semi-Dry Transfer Buffer äquilibriert. Außerdem wurden vier Filterpapiere (1,2 - 1,5 mm) in Fast Semi-Dry Transfer Buffer präinkubiert und mit dem Gel und der Membran in der Reihenfolge:

Anode – 2 Filterpapiere – PVDF-Membran – SDS-Gel – 2 Filterpapiere – Kathode

in der Apparatur Pierce Semi-Dry Blotter aufgebaut. Der Proteintransfer erfolgte für 10 min bei 25 V.

4.2.5.4.2 *Bindung von Antikörpern*

Für die Immundetektion von Proteinen mittels Antikörper wurde die Membran zunächst nach dem Proteintransfer eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung inkubiert. Nach einem Waschschrift in PBST (5 min) wurde sie mit dem Primärantikörper und anschließend dem Sekundärantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper wurden in PBST verdünnt und wie in Tab. 4.2-1

beschrieben eingesetzt. Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran jeweils dreimal für 10 min mit PBST gewaschen; vor der Detektion mit der ECL-Lösung wurde die Membran noch 10 min mit PBS gewaschen.

Tab. 4.2-1: Verwendung primärer und sekundärer Antikörper abhängig vom Zielprotein im Immunblot.

Zielprotein	Primärantikörper	Sekundärantikörper
His ₆ -Tag	Maus anti-His ₆ -HRP Roche 1:500	-
Tryptase	Maus anti-hTryptase Chemicon 1:2000	Ziege anti-Maus-HRP Dianova 1:5000
c-myc-Tag	Maus anti-c-myc Santa Cruz 1:1000	Pferd anti-Maus-HRP Cell Signaling 1:5000
Tryptase γ	Ziege anti-hTryptase γ R&D Systems 1:1000	Kaninchen anti-Ziege-HRP Dianova 1:10000

4.2.5.4.3 Detektion mittels ECL-Substrat

Die Antikörperbindung an das Zielprotein wurde schließlich mittels Spaltung des Luminol-basierten ECL-Substrats durch die Antikörper-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) detektiert. Dafür wurde die Membran mit dem Substrat eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und das Signal durch Auflegen eines Chemilumineszenz-Films aufgenommen.

4.2.5.5 Auswahl geeigneter Expressionsstämme mittels Dot Blot-Analyse

Nach Transformation von *P. pastoris*-Wirtsstämmen (s. 4.2.2.3) wurden geeignete Expressionsstämme mit Hilfe der Dot Blot-Analyse ausgewählt. Dazu wurden zunächst einzelne Stämme im Rahmen einer Testexpression im 10 ml-Maßstab für drei bis fünf Tage kultiviert (s. 4.2.3.1) und der Überstand schließlich nach Zentrifugation (10 min, 1500 x g) auf die Expressionsausbeute hin untersucht. Für die Dot Blot-Analyse wurde eine Nitrocellulosemembran (11,5 x 8,3 cm) in PBS äquilibriert (10 min, RT), in die Dot Blot-Apparatur eingespannt, mit PBS gewaschen und mittels Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Überstände der Hefekulturen (400 μ l) und Kontrollproben auf die Membran aufgetragen und etwa 2 h inkubiert. Nachdem Probenrückstände mittels Vakuum abgezogen worden waren, wurde die Membran einmal mit PBS gewaschen und über Nacht in Blockierungslösung (PBST/5 % Milch) bei 4°C inkubiert. Zur Detektion der Tryptase γ -Konstrukte wurde die Membran mit dem Maus anti-hu Mastzell-Tryptase-Antikörper (MAB1222/G3, Chemicon) (1:2000 in PBST, 1 h, RT) und einem Ziege anti-Maus-HRP-Antikörper (Dianova; 1:5000 in PBS, 1 h, RT) inkubiert. Danach wurde die Membran jeweils dreimal 5 min mit PBST und nach dem Sekundärantikörper zusätzlich einmal mit PBS gewaschen. Schließlich wurde die Antikörperbindung nach Herstellerangaben mit einem DAB-Substrat detektiert.

4.2.5.6 Deglykosylierung

Für die Bestimmung der N-Glykosylierung rekombinanter Proteine wurde das Zielprotein mit der Endoglycosidase Endo H_f behandelt. Dafür wurden zuerst das Zielprotein auf eine Konzentration von 1 µg/µl und die Endo H_f um den Faktor 1000 in PBS verdünnt und danach nach folgendem Pipettierschema in einem Reaktionsansatz eingesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert:

Reagenz	Volumen [µl]		
	Probe	Kontrolle 1	Kontrolle 2
Zielprotein	3	-	3
EndoH _f	1	1	-
Puffer G5 10x	1	1	1
ddH ₂ O	5	8	6
Gesamtvolumen	10	10	10

Anschließend wurden die Ansätze mit 2-fachem Tris-Glycin-Probenpuffer und DTT (10 µl) versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Analyse wurde zweimal durchgeführt.

4.2.5.7 Analyse der N-terminalen Sequenz und der Reinheit von Proteinen und Peptiden

Zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz von Proteinen und Peptiden wurden die Proben mittels SDS-PAGE getrennt (4.2.5.2), auf eine PVDF-Membran übertragen (4.2.5.4.1) und mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt. Für die Bestimmung ihrer Reinheit wurden die Proteinlösungen auf eine PVDF-Membran getropft und mit Coomassie gefärbt. Die angefärbten Membranstücke wurden ausgeschnitten und die Proteine mittels automatisierter Edman-Degradierung am Gasphase-Sequenator 473 (Applied Biosystems, Weiterstadt) von Herrn Reiner Mentele (MPI für Biochemie, Martinsried) sequenziert.

4.2.5.8 Gelfiltration

Die Quartärstruktur bzw. Oligomerisierung der Tryptasen wurde mittels Gelfiltration analysiert. Dafür wurden die Proteine mit dem Puffer A auf eine Konzentration von 500 ng/µl verdünnt. Die Proteinlösung (200 µl) wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare) am Äkta-Explorer (GE Healthcare) aufgetragen. Das Eluat wurde in 0,5 ml-Fractionen gesammelt und währenddessen wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Von den Elutionsfraktionen wurden Proben (50 µl) entnommen und die enzymatische Aktivität mit dem entsprechenden Substrat (s. Tab. 4.2-2) bestimmt.

Zur Kalibrierung der Superose 12 wurden die Proteine Ferritin (1 mg/ml), Catalase, Ovalbumin und Ribonuclease A (je 10 mg/ml) (Gel Filtration LMW + HMW Calibration Kit) in einem Verhältnis 1:10 mit dem Puffer B verdünnt. Die Lösung (100 µl) wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Superose 12 aufgetragen. Die Analyse wurde dreimal durchgeführt.

4.2.5.9 Heparin-Affinitätschromatographie

Die Heparinaffinität der Trypsasen wurde mittels Heparin-Affinitätschromatographie untersucht. Die Proteine wurden mit Puffer A auf eine Konzentration von 80 µg/ml verdünnt und die Lösung bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 0,3 ml/min auf eine TSKgel Heparin-5PW-Säule (rostfreier Stahl, 7,5 mm x 7,5 cm, Tosoh) am Äkta-Explorer aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mit Puffer A von der Säule gewaschen (5 CV) und gebundene Proteine mit einem Stufengradienten des Puffers B (je 5 CV von 25 %, 50 % und 100 % Puffer B) von der Säule eluiert. Das Eluat wurde fraktioniert (1 ml) gesammelt, die Absorption bei 280 nm bestimmt und von einzelnen Elutionsfraktionen die enzymatische Aktivität bestimmt. Die Analyse wurde zweimal durchgeführt.

4.2.5.10 CD-Spektroskopie

Für die Bestimmung der Konformation mittels CD-Spektroskopie wurden die rhTryptase γ und das Tryptase γ -Zymogen im Puffer CD-G und Tryptase β in Puffer CD-B auf die Konzentration von 6 µM verdünnt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proteinlösungen 10 min bei 95°C erhitzt.

Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco Spektropolarimeter J-715 (MPI, Martinsried) bei 37°C im fernen UV-Licht von 200 - 240 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in Quartzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Die gemessene molare Elliptizität ($[\theta]$ bzw. $\text{grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) bezogen auf die Anzahl der Aminosäurereste ergibt die mittlere molare Elliptizität ($[\theta/\text{aa}]$ bzw. MRE). Für die Analyse der Sekundärstrukturen wurde die mittlere molare Elliptizität durch den Umrechnungsfaktor 3298 dividiert, um den molaren zirkulären Dichroismus zu erhalten ($[\Delta\epsilon]$). Diese Werte wurden schließlich mit den Software-Programmen K2D2 [98] sowie K2D3 [97] ausgewertet.

Für den Vergleich der Anteile an Sekundärstrukturen wurden die Kristallstrukturen von Tryptase β (PDB 1A0L), Trypsin (PDB 1TRN), Trypsinogen (PDB 1TGN), α -Chymotrypsin B (PDB 5CGA) und α -Chymotrypsinogen (PDB 2CGA) aus der RCSB PDB-Datenbank (www.rcsb.org) [100] verwendet. Die Anteile an α -Helix und β -Faltblatt wurden jeweils den Werten „Author Sec. Struc.“ entnommen.

4.2.6 Enzymkinetische Methoden

4.2.6.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Proteasen wurden fluorogene Substrate verwendet. Die Fluoreszenz des freigesetzten Fluorophors AMC wurde über die Zeit (10 min) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm am Platten-Fluorimeter HTS (Perkin Elmer) bei 37°C gemessen. Die Bedingungen sind in Tab. 4.2-2 zusammen gefasst:

Tab. 4.2-2: Testbedingungen für die Messung der enzymatischen Aktivität der rhTryptase γ , Tryptase β und Trypsin. Für die Messung wurden die aufgeführten Komponenten in eine 96-well Platte pipettiert. Das Endvolumen beträgt 200 μ l.

<i>Protease</i>	<i>Protease-konzentration [nM]</i>	<i>Substrat</i>	<i>Substrat-konzentration [μM]</i>	<i>Puffer</i>
rhTryptase γ	20	Z-FR-AMC	10	TTP
Tryptase β	0,2	tos-GPR-AMC	5	TTP + 0,1 μ g/ml Heparin
Trypsin	0,01	tos-G-P-R-AMC	5	TTP

Bei der Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde jeweils eine AMC-Eichkurve (0 - 1 μ M) mitgeführt. Die Einstellungen am Fluorimeter wurden so gewählt, dass 1 μ M AMC mit 40.000 bis 60.000 RF gemessen wird. Mit Hilfe des AMC-Standards wurde der Substratverbrauch ermittelt, der maximal 5 % betragen sollte.

4.2.6.2 Bestimmung des pH-Optimums

Um das pH-Optimum der rhTryptase γ zu bestimmen wurde die enzymatische Aktivität in verschiedenen Pufferlösungen (PTP 1a - 5c) bestimmt. Diese decken einen pH-Bereich von pH 3 - 12 ab und enthalten verschiedene Salzkonzentrationen (150 mM, 500 mM, 1000 mM) sowie Heparinkonzentrationen (0 und 0,1 μ g/ml). Jeweils 100 μ l des Puffers wurde in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit rhTryptase γ bzw. β (50 μ l; Endkonz. 20 bzw. 0,2 nM) versetzt. Nach Zugabe des Substrats Z-Phe-Arg-AMC bzw. tos-Gly-Pro-Arg-AMC (50 μ l; Endkonz. 10 bzw. 5 μ M) wurde die enzymatische Aktivität über 10 min bei 37°C am Fluorimeter bestimmt. Die Analyse wurde dreimal durchgeführt.

4.2.6.3 Zymogenaktivierung

4.2.6.3.1 Aktivierung mit Trypsin

Um die Funktionalität des rekombinanten Tryptase γ -Zymogens zu untersuchen, wurde dessen Aktivierung mit Hilfe von Trypsin untersucht. Dazu wurde das Zymogen (125 nM) mit Trypsin (0,25 nM) über 48 h bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 24 und 48 h wurde die enzymatische Aktivität mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC (10 μ M) bestimmt. Für die Analyse mittels SDS-PAGE wurde 10 μ M Zymogen mit 10 nM Trypsin über 24 h bei 37°C

inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, und 24 h wurden Proben (10 µl) entnommen und für die Analyse entsprechend aufbereitet. Die Analyse wurde dreimal durchgeführt.

4.2.6.3.2 Aktivierung mit verschiedenen Proteasen

Um die Aktivierung des Zymogens durch verschiedene Proteasen zu bestimmen, wurde die Zunahme der enzymatischen Aktivität gemessen. Dazu wurde das Zymogen (500 nM) mit den Proteasen (je 10 nM) über 24 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen wurden die reifen Proteasen sowie rhTryptase γ (500 nM) allein über die Zeit inkubiert. Die Bedingungen der Inkubationsansätze sind in folgender Tabelle zusammen gefasst:

<i>Protease</i>	<i>Puffer</i>
rhTryptase γ	TTP
Cathepsin C	25 mM MES, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 6,0
Cathepsin G	TTP
Cathepsin V	25 mM Na-Acetat, 2,5 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 4,0
Cathepsin B	200 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 5,5
Cathepsin L	400 mM Na-Acetat, 4 mM EDTA, 8 mM DTT, pH 5,5
t-PA	TTP
Urokinase	TTP
Elastase	TTP
Thrombin	TTP
Plasmin	TTP
Kallikrein	TTP

Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 24 h wurden Proben (50 µl) entnommen und in einer Mikrotiterplatte zu dem TT-Puffer (100 µl) hinzugefügt. Nach Zugabe des Substrats Z-Phe-Arg-AMC (50 µl; Endkonz. 10 µM) wurde die enzymatische Aktivität über 10 min bei 37°C am Fluorimeter gemessen.

Zur Untersuchung der Aktivierung des Tryptase γ-Zymogens durch Tryptase β wurde das Zymogen (Endkonz. 3 µM) mit den Proteasen unter folgenden Bedingungen versetzt:

<i>Protease</i>	<i>Konzentration [nM]</i>	<i>Puffer</i>
Tryptase β-Monomer	3	TTP, pH 6,0, 200 µg/ml Heparin H8537
Tryptase β-Tetramer	30	TTP, pH 7,4, Heparin H0777
Trypsin	6	TTP, pH 7,4

Außerdem wurden zur Kontrolle die Ansätze mit Aprotinin (Endkonz. 10 µM) inkubiert und die rhTryptase γ (Endkonz. 3 µM) als Referenz im TT-Puffer inkubiert. Die Ansätze wurden über die Zeit bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 6 h wurden Proben entnommen, in TT-Puffer 1:60 verdünnt und mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC (Endkonz. 10 µM) versetzt. Die enzymatische Aktivität wurde über 10 min bei 37°C am Fluorimeter

gemessen. Für die Analyse wurde die Differenz der Aktivität mit und ohne aktivierende Protease bestimmt.

Für die Analyse der Aktivierung mittels SDS-PAGE wurden von den gleichen Ansätzen zu den gegebenen Zeitpunkten jeweils 10 µl Proben entnommen, mit Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95°C gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zum Zeitpunkt 6 h wurde außerdem eine Probe mit Probenpuffer ohne DTT behandelt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Analyse wurde dreimal durchgeführt.

4.2.6.4 Bestimmung der Spaltung von Peptidsubstraten mittels HPLC

Die Spaltung von Neuropeptiden durch die Tryptasen wurde mittels *Reversed Phase* Chromatographie an einer HPLC-Anlage untersucht. Dazu wurden die Peptide CGRP (50 µM), PHM (50 µM) sowie VIP (40 µM) mit der Tryptase β (1 nM) in TTP mit 50 µg/ml Heparin oder rhTryptase γ (50 nM) in TTP bis zu 3 h bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 0,5, 1 und 3 h wurden jeweils 180 µl der Ansätze entnommen und die Reaktion mit 20 µl 1 % TFA (Endkonz. 0,1 %, pH 3,5) abgestoppt. Für die Analyse der Spaltprodukte wurden die Proben (je 100 µl) auf eine *Reversed-Phase*-Säule (LiChrospher WP 100, RP-18, Merck) bei 17°C aufgetragen und nach folgender Methode (Tab. 4.2-3) mit einem acetonitrilhaltigen Puffer (Acetonitril LiChrosolv, 0,06 % TFA) eluiert. Die Peptide wurden bei einer Absorptionswellenlänge von 206 nm detektiert. Die Analyse wurde dreimal durchgeführt.

Tab. 4.2-3: HPLC-Gradient zur Analyse der Spaltung von Peptidsubstraten.

<i>Initiale Konzentration</i> [%]	<i>Rampe</i> [%/min]	<i>Endkonzentration</i> [%]	<i>Halten [min]</i>
1	0,5	60	0
60	80	80	0
80	-80	1	5
1	0	1	10

4.2.6.5 Bestimmung der Spaltung von Proteinsubstraten mittels SDS-PAGE

Um die Spaltung von Proteinsubstraten zu untersuchen, wurden die Proteine Prothrombin, Fibrinogen, sc-HMW-Kininogen und Casein (je 4 µg) mit rhTryptase γ (0,4 µg) in PBS versetzt und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen wurden die Proteine auch allein inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der Ansätze mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die zeitabhängige Analyse der Spaltung der Proteine Fibrinogen und sc-HMW-Kininogen wurden die Proteine (40 µg) mit rhTryptase γ sowie Tryptase β (je 0,8 µg) in TTP bzw. TTP/0,1 µg/ml Heparin versetzt. Zur Kontrolle wurden die Proteine und die Tryptasen einzeln inkubiert. Die Ansätze wurden über 24 h bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 0,25, 3, 6 und 24 h wurden jeweils 10 µl Probe entnommen und mittels SDS-Gel untersucht. Die Analyse wurde zweimal durchgeführt.

4.2.6.6 Aktivierung des pro-u-Plasminogen-Aktivators (pro-uPA)

Um die Aktivierung des pro-uPAs zu untersuchen, wurde die Aktivitätszunahme über die Zeit am Fluorimeter gemessen. Dazu wurde in einer Mikrotiterplatte der Puffer TTP mit 0,1 µg/ml Heparin vorgelegt und pro-uPA (Endkonz. 1 µM) sowie Plasmin (0,1 nM) oder rhTryptase γ (100 nM) zugegeben. Nach Zugabe des Substrats Boc-LGR-AMC (20 µM) wurde die enzymatische Aktivität über 30 min bei 37°C gemessen. Zur Kontrolle wurden pro-uPA sowie Plasmin und rhTryptase γ einzeln gemessen.

Zur Bestimmung der Prozessierung mittels SDS-PAGE wurde pro-uPA (10 µg) mit den Proteasen Plasmin, Thrombin, Tryptase β und rhTryptase γ (je 0,4 µg) in TT-Puffer mit 0,2 µg/ml Heparin 30 min bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 und 30 min wurden jeweils 10 µl Probe und mittels SDS-PAGE analysiert.

4.2.6.7 Bestimmung der Substratspezifität mittels Peptid-Substratbibliotheken

Zur Analyse der Substratspezifität der Tryptasen wurden die *Position Scanning Libraries* und *Hybrid Combinatorial Libraries* (M. Drag, Universität Wrocław, Polen) verwendet. Dazu wurden die rhTryptase γ (Endkonz. 1 nM) in TTP und die Tryptase β (Endkonz. 0,5 nM) in TTP + 0,1 µg/ml Heparin mit den Substraten (jeweils Endkonz. 5 µM) in einer Mikrotiterplatte versetzt. Die enzymatische Aktivität wurde über 30 min bei 37°C gemessen. Die Messungen wurden dreimal durchgeführt und die Mittelwerte ± SEM mittels GraphPad Prism ermittelt.

4.2.6.8 Bestimmung kinetischer Kenngrößen

Die Reaktion von Enzymen bzw. Proteasen mit Substraten basiert auf der Gleichung



mit E = Enzym

S = Substrat

P = Produkt.

Daraus ergibt sich die Michaelis-Menten-Gleichung

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

und die Gleichung für die Umsatzrate k_{cat}

$$k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E]}$$

mit V = Reaktionsgeschwindigkeit

K_m = Michaelis-Menten Konstante.

Mit deren Hilfe lassen sich kinetische Kenngrößen der Substrate für Enzyme wie die Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Umsatzrate (k_{cat}) und katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) ermitteln. Um diese experimentell zu bestimmen, wurden Substrate über 12 Kavitäten im TT-

Puffer mit 10 % DMSO in einer Mikrotiterplatte seriell verdünnt (0 – 50 μ M; Endvolumen 50 μ l). Anschließend wurde die jeweilige Protease (50 μ l) zugegeben. Die Konzentration wurde an die Messbedingungen angepasst:

<i>Protease</i>	<i>Konzentrationsbereich [nM]</i>
rhTryptase γ	5 – 200
Tryptase β	100 – 500
Trypsin	100 – 500
Thrombin	100 – 200

Die enzymatische Aktivität wurde über 10 min bei 37°C am Fluorimeter gemessen. Diese Messungen wurden dreimal durchgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten (V_0) wurden in Abhängigkeit zu den Substratkonzentrationen aufgetragen. Mittels nicht-linearer Regression sowie Michaelis-Menten-Gleichung wurden die Werte der K_m und V_{max} ermittelt. Mit Hilfe der Gleichung für die Umsatzrate wurde k_{cat} und schließlich die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) ermittelt. Bei Trypsin und Thrombin konnte aufgrund der Löslichkeitsgrenze der Substrate die Substratsättigung nicht erreicht werden. Daher wurde k_{cat}/K_m über die Steigung $V/[S]$ bei niedrigen Substratkonzentrationen ermittelt.

Die relative Fluoreszenz des Fluorophors ACC ist um den Faktor 1,7 (eigene Daten) größer als die des AMC. Bei der Bestimmung der katalytischen Kenngrößen der ACC-Substrate wurde dieser Faktor mit einberechnet.

4.2.6.9 Einfluss von Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität

4.2.6.9.1 Klassifizierung des proteolytischen Mechanismus der rhTryptase γ

Um den katalytischen Mechanismus der rhTryptase γ zu überprüfen, wurde die Hemmung mit Inhibitoren verschiedener Proteasefamilien untersucht. Dazu wurden rhTryptase γ (20 nM) und β (0,2 nM) mit den Inhibitoren (Tab. 4.2-4) in der Mikrotiterplatte 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Restaktivitäten über 10 min bei 37°C gemessen. Der Vergleich der Aktivitäten ergab die prozentuale Inhibition. Die Messungen wurden zweimal wiederholt.

Tab. 4.2-4: Verwendete Inhibitoren zur Klassifizierung des katalytischen Mechanismus.

<i>Inhibitor</i>	<i>Endkonzentration [mM]</i>
E64	0,01
1,10-Phenanthrolin	0,1
EDTA	10
EGTA	10
Pefabloc SC	10
PMSF	10

Zur Identifizierung von Inhibitoren gegen rhTryptase γ wurden 109 natürlich vorkommende und synthetische Inhibitoren tryptischer Proteasen, eine Bibliothek von 790 Tryptase β -Inhibitoren der Firma Altana und 55 Tryptase β -Inhibitoren unserer Arbeitsgruppe, die in Kooperation mit N. Schaschke entwickelt wurden, untersucht. Dazu wurde rhTryptase γ (20 nM) mit den Inhibitoren (Endkonz. 100 μ M) in TT-Puffer 1 h bei 37°C in der Mikrotiterplatte inkubiert und die prozentuale Inhibition bestimmt. Es wurden acht Inhibitoren identifiziert, die rhTryptase γ signifikant hemmen und von ihnen wurden im Folgenden die Dissoziationskonstanten bestimmt.

4.2.6.9.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i

Für die Ermittlung der Dissoziationskonstanten wurden die Tryptasen mit steigenden Inhibitorkonzentrationen unter folgenden Bedingungen präinkubiert:

	<i>rhTryptase γ</i>	<i>Tryptase β</i>
Proteasekonzentration	20 nM	0,2 nM
Puffer	TTP	TTP 0,1 μ g/ml Heparin
Substrat	Z-FR-AMC 10 μ M	tos-GPR-AMC 5 μ M
Inkubation	1 h, 37°C	1 h, 37°C
	max. Inhibitorkonzentration [μ M]	
Benzamidin	100.000	1000
SBTI	0,5	200
Ecotin	0,1	1
α 1PI	200	300
Aprotinin	100	100
Arg15-Aprotinin	100	100
LBTI	200	200
Antipain	100	100
Byk296172	20	0,1
rLDTI	10	0,1
APC-366	25	25
Gabexat mesylat	400	1
Nafamostat mesylat	20	$1 \cdot 10^{-3}$

Dazu wurden die Inhibitoren seriell über 12 Kavitäten in einer Mikrotiterplatte verdünnt (Endvol. 100 μ l). Anschließend wurden die Tryptasen (50 μ l) zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen des Gleichgewichts (steady-state Kinetik) wurde das Substrat (Tab. 4.2-2) zugegeben und die enzymatische Aktivität über 10 min bei 37°C bestimmt.

Anschließend wurde die Restaktivität abhängig von der Inhibitorkonzentration analysiert und die Dissoziationskonstante unter Einbeziehung der Morrison-Gleichung [101] ermittelt:

$$Y = V_0 \cdot \left(1 - \frac{\left(\left(E_t + X + \left(K_i \cdot \left(1 + \frac{S}{K_m} \right) \right) \right) - \left(\left(\left(E_t + X + \left(K_i \cdot \left(1 + \frac{S}{K_m} \right) \right) \right)^2 - 4 \cdot E_t \cdot X \right)^{0,5} \right)}{2 \cdot E_t} \right) + V_s \right)$$

Die Messungen wurden dreimal durchgeführt, jeweils die K_i -Werte mit der Software profit ermittelt und die Mittelwerte \pm SEM angegeben.

4.2.6.9.3 Quantifizierung der spezifischen Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der rhTryptase γ wurde der Inhibitor SBTI mit einer max. Konzentration von 2 μ M über 12 Kavitäten in einer Mikrotiterplatte seriell im Puffer TTP verdünnt (je Endvol. 100 μ l). Die rhTryptase γ (je ca. 1 μ M; 50 μ l) wurde zugegeben und die Ansätze eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Substrat Z-LR-AMC dazu pipettiert (je 50 μ l, Endkonz. 10 μ M) und die enzymatische Aktivität über 10 min bei 37°C gemessen. Für die Bestimmung der Enzymkonzentration wurde die enzymatische Aktivität abhängig von der Inhibitorkonzentration aufgetragen und durch die Anpassung an die Morrison-Gleichung (s. o.) ermittelt. Durch Einbeziehen des Verdünnungsfaktors wurde die Konzentration an enzymatisch aktiver Protease bestimmt. Diese wurde auf die ermittelte Proteinkonzentration bezogen und die spezifische Aktivität quantifiziert.

4.2.6.9.4 Salzabhängigkeit

Um den Einfluss von Salzen auf die enzymatische Aktivität der Tryptasen zu untersuchen, wurden Hemmkinetiken nach dem Prinzip der K_i -Bestimmung durchgeführt. Dazu wurden die Salze (NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2), Histamin sowie ZnCl_2 (max. Endkonz. 1 M bzw. 0,2 M) in TTP seriell über 12 Kavitäten in einer Mikrotiterplatte verdünnt (Endvol. 100 μ l). Die Ansätze mit ZnCl_2 wurden zusätzlich in TTP/pH 6,0 verdünnt. Anschließend wurden die rhTryptase γ und β (je 50 μ l; 20 bzw. 0,2 nM) sowie das jeweilige Substrat (Tab. 4.2-2) zugegeben und die enzymatische Aktivität über 10 min bei 37°C bestimmt. Die Ansätze mit ZnCl_2 wurden vor der Substratzugabe 1 h bei 37°C inkubiert. Die gemessene Restaktivität wurde gegenüber den Salzkonzentrationen aufgetragen und die IC_{50} -Werte mit Hilfe nicht-linearer Regression und *Logistic Equation* [102] ermittelt:

$$p = p_{\min} + \left(\frac{p_{\max} - p_{\min}}{1 + \left(\frac{[I]_0}{I_{50}} \right)^n} \right)$$

mit p = Prozent Inhibition

$[I]_0$ = Inhibitorkonzentration.

4.2.6.9.5 Inhibition durch Serumproteine

Die Proteasen rhTryptase γ , Tryptase β und Trypsin (5 μ l; Endkonz. 1 μ M) wurden zu humanem Serum (95 μ l) zugegeben und 1 h bzw. über 24 h bei 37°C unter Schütteln (400 rpm) inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Ansätze im jeweiligen Puffer (Gesamtvol. 200 μ l) im Verhältnis 1:10, 1:30 und 1:100 in der Mikrotiterplatte verdünnt und mit folgenden Substraten (Endkonz. je 10 μ M) versetzt:

<i>Protease</i>	<i>Substrat</i>	<i>Puffer</i>
rhTryptase γ	Z-FR-AMC	TTP
Tryptase β	Boc-LKR-AMC	TTP + 0,1 μ g/ml Heparin
Trypsin	Z-LR-AMC	TTP

Die enzymatische Aktivität wurde über 10 min bei 37°C im Fluorimeter gemessen. Die Analyse wurde dreimal durchgeführt und es wurde zusätzlich α 2-Macroglobulin im Serum durch Inkubation mit Methylamin (100 mM, ÜN, 37°C) deaktiviert.

4.2.6.9.6 Bestimmung der Komplexbildung mit physiologischen Inhibitoren mittels

Aktivitätsmessung und SDS-PAGE

Um die Art der Inhibition der rhTryptase γ durch α 1PI und ATIII zu untersuchen, wurden die Inhibitoren in drei Ansätzen seriell über 12 Kavitäten in einer Mikrotiterplatte (Endvol. 100 μ l) verdünnt. Anschließend wurden die Proteasen (100 μ l) zugegeben und die Ansätze über die Zeit bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 1, 4 und 24 h wurden Proben (20 μ l) entnommen und im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nach Zugabe der Substrate (20 μ l) zu den 1:1- und den 1:10-Ansätzen wurde die enzymatische Aktivität über 10 min bei 37°C am Fluorimeter gemessen. Die Testbedingungen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

<i>Reagenz</i>	<i>rhTryptase γ</i>	<i>Trypsin</i>
Proteasekonzentration	200 nM	20 nM
Puffer	TTP	TTP
α 1PI	0 - 250 μ M	0 - 0,2 μ M
ATIII	0 - 500 μ M	-
Substrat	10 μ M Z-FR-AMC	20 μ M bz-R-AMC

Die gemessenen Aktivitäten wurden auf die höchste Aktivität normalisiert. Die relativen Aktivitäten wurden gegenüber den Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und die Hemmkurven mittels nicht-linearer Regression (GraphPad Prism) erstellt.

Zur Analyse der Komplexbildung wurden die Proteasen nach folgendem Schema mit den Inhibitoren über 24 h bei 37°C inkubiert:

<i>Reagenz</i>	<i>rhTryptase γ</i>	<i>Trypsin</i>	<i>Faktor Xa</i>
Proteasekonzentration [μ M]	5	5	5
α 1PI [μ M]	10	10	-
Puffer	TTP	TTP	-
ATIII [μ M]	10	-	10
Puffer	TTP + 50 μ g/ml Heparin	-	TTP + 50 μ g/ml Heparin

Zu den Zeitpunkten 0, 1, 4 und 24 h wurden jeweils Proben (10 μ l) entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden anschließend mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Die Analyse wurde dreimal durchgeführt.

4.2.7 Immunbiologische Methoden

4.2.7.1 Immunisierung von Kaninchen mit rhTryptase γ

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen rhTryptase γ wurden zwei Kaninchen mit rhTryptase γ immunisiert (Firma Biogenes). Dafür wurde rhTryptase γ (1,6 mg/ml; 2 ml), die in Puffer mit pH 5,0 und 1 M NaCl gelagert wird, zunächst gegen einen physiologischen Puffer dialysiert (Dialysepuffer 1 und 2, je 2 l, 2 h, 4°C; Ausschlussgrenze je 3,5 kDa). Die Immunisierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

<i>Tag</i>	<i>Vorgehen</i>
1	Erstimmunisierung und Blutung (1,5 ml Präimmunserum)
7	2. Immunisierung
14	3. Immunisierung
28	4. Immunisierung und Blutung (25 ml)
35	Blutung (25 ml)

Nach Erhalt des Präimmunserums sowie der Seren nach den beiden Blutungen an Tag 28 und 35 wurden zur Bestimmung der Affinität und Spezifität der Seren indirekte ELISAs durchgeführt (s. 4.2.7.3.1). Die Analyse wurde zweimal durchgeführt.

4.2.7.2 Isolierung spezifischer anti-Tryptase γ -Antikörper

4.2.7.2.1 Kopplung der Tryptasen an AminoLink Coupling Resin

Für die Immobilisierung der rhTryptase γ (1,6 mg/ml) sowie der Tryptase β (1,9 mg/ml) an ein *AminoLink Coupling Resin* über primäre Aminogruppen wurden die Proteinlösungen zuerst gegen den Kopplungspuffer dialysiert (je 5 mg Protein, Kopplungspuffer 2 x 2 h, 1 l, 4°C, Ausschlussgrenze 6 - 8 kDa). Währenddessen wurden 4 ml einer *AminoLink Coupling Resin*-Suspension, entsprechend 2 ml Säulenvolumen, mit drei Säulenvolumen (6 ml) Kopplungspuffer in einer Leersäule (5 ml, 3,8 x 0,65 cm, h x r) äquilibriert. Nach der Dialyse wurde die

Proteinlösung zu dem Säulenmaterial gegeben, mit Cyanoborhydridlösung (40 µl, Endkonz. 50 mM) versetzt und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung von der Säule abgelassen, der Durchfluss aufbewahrt und auf das Vorhandensein restlicher Tryptasen mittels enzymatischer Aktivitätsmessung und Proteinbestimmung am Photometer bei 280 nm Wellenlänge überprüft. Zur Blockierung freier Kopplungsstellen wurde das Säulenmaterial zuerst mit 2 CV Quenching Puffer (4 ml) gewaschen und daraufhin mit 1 CV Quenching Puffer (2 ml) und Cyanoborhydridlösung (40 µl, Endkonz. 50 mM) 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurde das Säulenmaterial mit 5 CV Waschlösung (10 ml) und mit 3 CV Lagerungspuffer (6 ml) gewaschen. Bis zur Verwendung wurde das Säulenmaterial in ca. 2 CV Lagerungspuffer (3 - 4 ml) bei 4°C aufbewahrt.

4.2.7.2.2 Isolierung der anti-Tryptase γ -Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Zur Isolierung spezifischer gegen Tryptase γ gerichteter Antikörper aus den Kaninchenserum wurde zuerst eine Affinitätschromatographie mit immobilisierter rhTryptase γ und anschließend eine negative Affinitätschromatographie mit Tryptase β durchgeführt. Dazu wurde zunächst die *Amino Link Coupling Resin*-rhTryptase γ -Säule (2 ml; 1,5 x 0,65, h x r) mit dem Auftragspuffer PBS äquilibriert, das Serum (7,5 ml) eines Kaninchens mit PBS (2,5 ml) versetzt und dieses in einer Endlosschleife mit einer Flussrate von 1 ml/min über Nacht bei 4°C auf das Säulenmaterial aufgetragen. Anschließend wurde die Lösung abgelassen, die Durchflussfraktion aufbewahrt und ungebundene Proteine mit PBS von dem Säulenmaterial gewaschen, bis eine $A_{280} < 0,02$ erreicht wurde. Die Elution der Antikörper wurde durch eine starke pH-Verschiebung erzwungen. Dazu wurde der stark saure Elutionspuffer mit pH 2,5 auf das Säulenmaterial mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen und das Eluat in Reaktionsgefäßen mit einem vorgelegten Neutralisierungspuffer (70 µl, pH 9,0) fraktioniert aufgefangen (1 ml). Die Elutionsfraktionen mit den höchsten Absorptionswerten bei 280 nm wurden gesammelt (9 ml) und für die Aufreinigung mittels *Amino Link Coupling Resin*-Tryptase β -Säule zweimal 2 h und einmal über Nacht bei 4°C gegen PBS (2 l) mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Da dialysiert.

Für die negative Affinitätschromatographie mit Tryptase β wurde analog der Affinitätschromatographie mit Tryptase γ vorgegangen. Das Eluat der ersten Chromatographie wurde auf eine *Amino Link Coupling Resin*-Tryptase β -Säule (2 ml; 1,5 x 0,65 cm, h x r) aufgetragen (1 ml/min, ÜN, 4°C). Anschließend wurde die Lösung abgelassen, diese Durchlauf-fraktion (8,5 ml) wurde mit 10 % Glycerin versetzt und bei -20°C sowie -80°C aufbewahrt. Schließlich wurde die Säule gewaschen, gebundene Antikörper wie oben beschrieben von dem Säulenmaterial eluiert, das Säulenmaterial mit PBS + 0,01 % Azid versetzt und bei 4°C gelagert.

Zur Bestimmung der Spezifität und Affinität der isolierten Antikörper wurden mit den einzelnen Fraktionen der beiden Chromatographien indirekte ELISA-Assays durchgeführt (s. 4.2.7.3.1). Die Analyse wurde dreimal durchgeführt.

4.2.7.3 Indirekter Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.2.7.3.1 Indirekter ELISA mit konstanter Antigenkonzentration

Die Bestimmung der Spezifität von Seren und Antikörpern erfolgte mittels indirektem ELISA. Dafür wurden die Antigene (Tab. 4.2-5) im Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt, mit einem Volumen von 100 µl auf eine MaxiSorb-Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit PBST (300 µl/Kavität) gewaschen. Das jeweilige Serum oder Antikörper (Tab. 4.2-6) wurde in Reaktionsgefäßen in PBS mit 2 % BSA über 16 Stufen verdünnt (1:50, 1:100, 1:500, 1:2000, 1:6000, weiter in 1:3-Schritten), von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl pro Kavität auf die Mikrotiterplatte pipettiert und diese 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte viermal mit PBST gewaschen (300 µl/Kavität), der entsprechende Sekundärantikörper (100 µl/Kavität) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde viermal mit PBST und einmal mit PBS (je 300 µl/Kavität) gewaschen.

Bei der Verwendung des indirekten ELISAs zur Analyse der Spezifität während der Isolierung von anti-Tryptase γ-Antikörper aus Kaninchenserum wurde das Substrat ABTS verwendet. Dieses wurde in einem leicht sauren Puffer mit Wasserstoffperoxid frisch angesetzt und 100 µl/Kavität zugegeben. Die Farbentwicklung wurde nach 45 min bei 37°C bei einer Absorption von 405 nm gemessen. Für die Bestimmung der Kreuzreaktivitäten verschiedener Antikörper wurde dagegen das Substrat 1-Step Ultra-TMB verwendet. Dieses wurde 30 min bei 37°C inkubiert (100 µl/Kavität), die Reaktion durch Zugabe einer H₂SO₄-Lösung (2 M, 100 µl) angehalten und die Farbentwicklung bei einer Absorption von 450 nm gemessen.

Die Titer, d.h. die Verdünnung mit halbmaximaler Reaktion, wurden analog der IC₅₀-Werte von Salzen mittels nicht-linearer Regression und *Logistic Equation* (s. a. 4.2.6.9.4) bestimmt.

Tab. 4.2-5: Verwendung der Antigene im indirekten ELISA.

Antigen	Stocklösung [mg/ml]	Assaykonzentration [µg/ml]
Tryptase α	1,5	5
Tryptase β	1,9	5
rhTryptase γ	1,6	5
rhTryptase γ Zymogen	0,9	5
Tryptase δ	0,5	5
Trypsin	2,8	5

Tab. 4.2-6: Verwendung der Antikörper im indirekten ELISA.

<i>Antikörper</i>	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
AA1	Ziege anti-Maus-HRP, Dianova	1:5000
AF1667	Kaninchen anti-Ziege-HRP, Dianova	1:5000
H9	Ziege anti-Maus-HRP, Dianova	1:5000
Kaninchen-Serum	Ziege anti-Kaninchen-HRP, Dianova	1:7500
KII	Ziege anti-Kaninchen-HRP, Dianova	1:5000
MAB1222/G3	Ziege anti-Maus-HRP, Dianova	1:5000
MAB1667	Kaninchen anti-Ratte-HRP, Sigma	1:5000
sTE1	Kaninchen anti-Ziege-HRP, Dianova	1:5000
TGII/IV	Ziege anti-Kaninchen-HRP, Dianova	1:5000
TPSD1	Ziege anti-Kaninchen-HRP, Dianova	1:5000

4.2.7.3.2 Indirekter ELISA mit steigender Antigenkonzentration

Zur Bestimmung der Affinität von Tryptase γ -Antikörpern zum Antigen wurde der indirekte ELISA mit steigenden Antigenkonzentrationen verwendet. Dazu wurde rhTryptase γ in einer Verdünnungsreihe über 16 Stufen mit dem Beschichtungspuffer seriell verdünnt (max. Konz. 2 $\mu\text{g/ml}$), auf eine Mikrotiterplatte pipettiert (100 μl /Kavität) und inkubiert (ÜN, 4°C). Danach wurde wie oben beschrieben vorgegangen und die Antikörper wie in Tab. 4.2-7 angegeben, eingesetzt. Die Antikörperbindung wurde mit der 1-Step Ultra-TMB-Substratlösung detektiert.

Tab. 4.2-7: Verwendung der Antikörper im indirekten ELISA mit unterschiedlicher Antigenkonzentration.

<i>Primärantikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Verdünnung</i>
AF1667	1:250	Kaninchen anti-Ziege-HRP	1:5000
MAB1222	1:250	Ziege anti-Maus-HRP	1:5000
MAB1667	1:250	Kaninchen anti-Ratte-HRP	1:5000
TGIV	1:250	Ziege anti-Kaninchen-HRP	1:5000

4.2.7.4 Sandwich ELISA

Zur Detektion spezifischer Proteine in Lösungen wurde der Sandwich-ELISA durchgeführt. Dazu wurde zuerst der entsprechende Beschichtungsantikörper im Beschichtungspuffer verdünnt, auf die Kavitäten der Mikrotiterplatte aufgebracht (100 μl) und die Ansätze inkubiert (ÜN, 4°C). Anschließend wurden die Kavitäten gewaschen (PBST, 3 x 300 μl) und mit Blockierungslösung inkubiert (PBST, 5 % BSA; 1 h, 37°C). Die Proteine und Antikörper wurden wie in 4.2.7.4.1 - 4.2.7.4.3 beschrieben inkubiert (100 μl , 1 h, 37°C). Schließlich wurden die ungebundenen Antikörper mit PBST und PBS (4 x bzw. 1 x, je 300 μl) entfernt. Die Antikörperbindung wurde mit dem 1-Step Ultra TMB-Substrat detektiert. Zur Optimierung des Tryptase γ -Sandwich-ELISA wurde nach der Inkubation mit dem Detektionsantikörper mit Blockierungslösung (PBST, 5 % BSA, 1 h, 37°C) inkubiert. Die einzelnen Komponenten

im Sandwich-ELISA wurden abhängig von der Fragestellung nach folgenden Tabellen eingesetzt.

4.2.7.4.1 Position der Antikörper in Sandwich-ELISA

Versuch	Beschichtungs- antikörper		Antigen		Detektions- antikörper		HRP-konjugierter Sekundärantikörper
	Name	Verd.	Name	Konz.	Name	Verd.	
A	AF1667	1:250, 1:500, 1:1000	rhTy	5 µg/ml	TGIV	1:250, 1:500, 1:1000	Ziege anti-Kaninchen-HRP, 1:5000
B	TGIV	1:250, 1:500, 1:1000	rhTy	5 µg/ml	AF1667	1:250, 1:500, 1:1000	Kaninchen anti-Ziege-HRP, 1:5000

4.2.7.4.2 Ermittlung der Antikörper-Verdünnungen im Sandwich-ELISA

Beschichtungs- antikörper		Antigen		Detektions- antikörper		HRP-konjugierter Sekundärantikörper
Name	Verd.	Name	Konz.	Name	Verd.	
AF1667	1:250, 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000	rhTy	max. 1 µg/ml, 8 Stufen 1+1	TGIV	1:250	Ziege anti-Kaninchen-HRP, 1:5000
AF1667	1:250, 1:500	rhTy	max. 1 µg/ml, 8 Stufen 1+1	TGIV	1:250, 1:500, 1:1000	Ziege anti-Kaninchen-HRP, 1:5000

4.2.7.4.3 Tryptase γ -Sandwich-ELISA

Komponente	Verwendung
AF1667	1:250
rhTryptase γ , -Zymogen	0 - 0,2 µg/ml
Tryptase α , β , δ ; Trypsin	0 - 10 µg/ml
TGIV	1:250
Ziege anti-Kaninchen-HRP	1:5000

4.2.7.4.4 Bestimmung der Validierungskriterien

Zur Validierung des Kalibrierbereichs wurde der Tryptase γ -Sandwich-ELISA an sieben Tagen durch zwei Anwender durchgeführt. Die Mittelwerte \pm SD wurde mit der Software GraphPad Prism ermittelt und in einem log-log-Diagramm aufgetragen. Der Variationskoeffizient (% VK) ergibt sich aus dem Verhältnis $SD \cdot 100$ durch Mittelwert. Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurde aus dem Mittelwert der Leerwerte + 10x SD bestimmt. Bei der Validierung der Selektivität wurden die Versuche an drei verschiedenen Tagen durchgeführt und die Mittelwerte \pm SEM mittels GraphPad Prism ermittelt.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der rhTryptase γ in Serum wurde humanes Serum in den Verhältnissen 1:5, 1:10 und 1:50 in PBS verdünnt und mit 25 ng/ml und 100 ng/ml rhTryptase γ versetzt. Diese Ansätze wurden als Proben mittels Sandwich-ELISA analysiert. Die Messwerte wurden anhand der Standardkurve mit Hilfe der Software GraphPad Prism interpoliert und somit die Konzentrationen ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus drei verschiedenen Messungen. Der Bias wurde über das Verhältnis Messergebnis gegenüber Sollwert*100 bestimmt.

4.2.7.5 Bestimmung der Wiederfindungsrate rekombinanter Tryptasen mit kommerziellen ELISA-Kits

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate der rekombinanten Tryptasen mit Hilfe kommerzieller ELISA-Kits wurden die Tryptasen α , β , δ , γ und γ -Zymogen in PBS sowie 10 %-igem Serum verdünnt und abhängig vom Detektionsbereich des jeweiligen Kits eingesetzt. Die ELISA-Kits wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Der ImmunoCAP-Assay wurde durch die Firma Labor Limbach, Heidelberg ausgeführt. Die verwendeten Tryptase-Konzentrationen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

<i>ELISA-Kit</i>	<i>Zielprotein</i>	<i>Detektionsbereich [ng/ml]</i>	<i>Tryptasen [ng/ml]</i>
SEB070Hu	Tryptase (TPS)	0,3 - 20	0,4, 2, 10, 50
E10501h	Tryptase γ (TPSG1)	0,03 - 2	0,0625, 0,25, 1, 2
CSB-E09012h	Tryptase γ (TPSG1)	0,3 - 20	0,625, 2,5, 10, 20

4.2.8 Bioinformatik

4.2.8.1 Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Für den Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurde das Software-Programm MacVector verwendet. Zu untersuchende Sequenzen wurden mit Hilfe der Funktion Clustal W verglichen.

4.2.8.2 Erstellung von Tryptase γ -Modellen

Zur Erstellung von Strukturmodellen der katalytischen Domäne der wt-Tryptase wurden zunächst die Kristallstrukturen der Tryptase β (PDB 1A0L) und Prostasin (PDB 3E0N) aus der Datenbank RCSB PDB (www.rcsb.org) [100] entnommen. Diese dienten als Templates zur Modellierung der katalytischen Domäne der wt-Tryptase γ (I38-R267) mit Hilfe der Software Swiss-Model [103-106]. Die beiden Modelle wurden mit der 3D-Struktur des Tryptase β -Monomers mittels der Software PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC) visualisiert und verglichen.

5 Ergebnisse

5.1 Evaluierung von Expressionskonstrukten für die Herstellung von Tryptase γ in *Pichia pastoris*

Für die präparative Herstellung der Tryptase γ wurden zunächst Expressionskonstrukte evaluiert, die aus Vorarbeiten von U. Sauer [96] in der Arbeitsgruppe vorlagen. Für die heterologe Expression des Zymogens und der vollständig prozessierten, reifen Form der Tryptase γ in der Hefe *P. pastoris* sind in diesen Konstrukten die für die Signal- bzw. Signal- und Propeptid kodierenden Sequenzen durch das *S. cerevisiae*- α -Faktor-Signalpeptid ersetzt (Abb. 5.1-1); es vermittelt die Sekretion des Proteins in den Hefeüberstand und wird während des Transports in der Zelle durch die Protease KEX2 abgespalten. Außerdem wurde die C-terminale hydrophobe Domäne (L282-D321) durch einen c-myc-Hexahistidin (His_6)-Tag ausgetauscht ($\text{T}\gamma\Delta\text{C}$), um die Löslichkeit des rekombinanten Proteins zu erhöhen und die Aufreinigung und Detektion im Verlauf der Herstellung zu erleichtern. Diese Konstrukte wurden für die Expression unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren Promotors Alkoholoxidase 1 (AOX1) in den Vektor pPICZ α A kloniert und die Plasmide pPICZ α A-proT $\gamma\Delta\text{C}$ und pPICZ α A-rT $\gamma\Delta\text{C}$ anschließend für die Transformation des *P. pastoris* X33 Wirtstammes verwendet.

Für die Testexpression im Schüttelkolben (500 ml) wurden die rekombinanten Stämme in glycerinhaltigem Vollmedium (BMGY) hochgezogen, bis eine OD_{600} von 3 erreicht war.

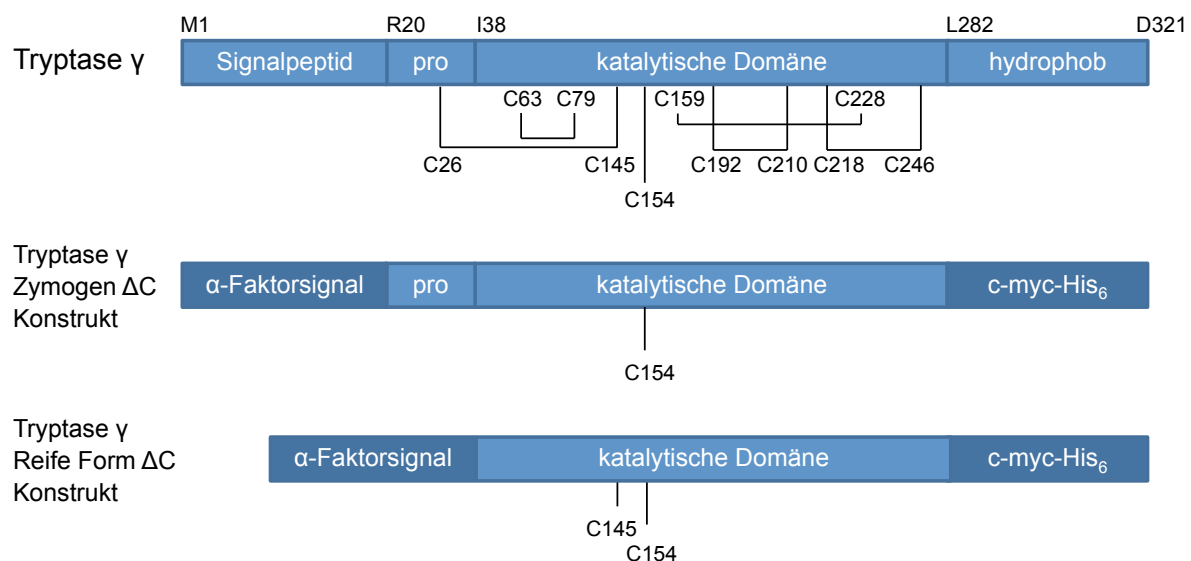


Abb. 5.1-1: Domänenstruktur der Tryptase γ und der für die rekombinante Expression in *P. pastoris* hergestellten Konstrukte. In der Wildtypform sind alle Cysteinreste, in den Expressionskonstrukten nur die potenziell freien dargestellt. Die Disulfidbrücken sind entsprechend der Voraussage von Uniprot Q9NRR2 angegeben.

Anschließend wurde die Expression durch die Zugabe von 1 % Methanol alle 24 Stunden über drei Tage induziert. Für die Bestimmung der Expressionsausbeute mittels Immunblot wurden Proben des Hefeüberstandes (1 ml) mittels TCA (10 %) gefällt, unter reduzierenden (+DTT) bzw. nicht-reduzierenden (-DTT) Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die rekombinanten Proteine nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einem anti-His₆-Antikörper detektiert. Das rekombinante Zymogen (proTyΔC) ist sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen als prominente Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 40 kDa nachweisbar (Abb. 5.1-2). Dagegen ist die rekombinante katalytische Domäne der Tryptase γ (rTyΔC) nur unter reduzierenden Bedingungen und als deutlich schwächere Bande bei ca. 35 kDa sichtbar, unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist dagegen eine breitere Bande bei einem Molekulargewicht > 120 kDa zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Zymogen der Tryptase γ in größeren Mengen von *P. pastoris* in den Überstand sekretiert wird, sodass dieses Expressionskonstrukt für die rekombinante Expression des Zymogens geeignet erscheint; die präparative Expression ist in Kapitel 5.3 beschrieben. Die Testexpression der katalytischen Domäne der Tryptase γ zeigt dagegen, dass mit dem Konstrukt pPICZαA-rTyΔC nur sehr geringe Mengen hergestellt werden können und dass es außerdem zur Ausbildung disulfidverbrückter Aggregate kommt. Diese können durch die zwei Cysteinreste C145A und C154A begründet sein, die im Sequenzvergleich der katalytischen Domäne mit anderen Serinproteasen und dem Zymogen zusätzlich vorkommen bzw. frei vorliegen (Abb. 5.1-1). Dieses Konstrukt erscheint daher für eine präparative Expression nicht geeignet.

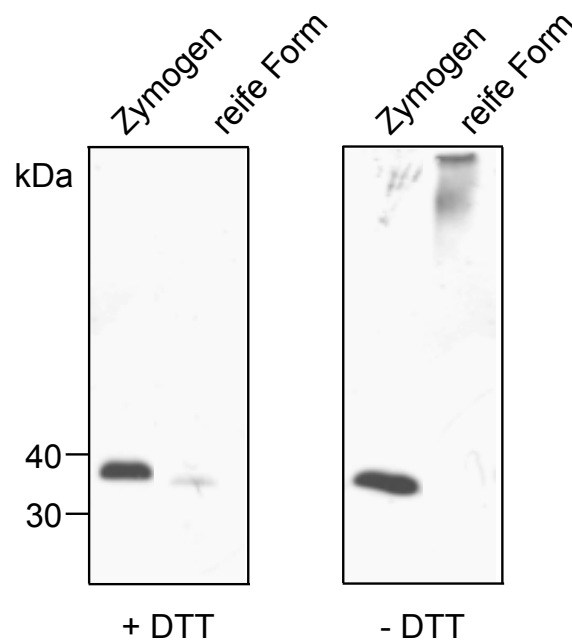


Abb. 5.1-2: Testexpression des Zymogens und der katalytischen Domäne der Tryptase γ. Nach dreitägiger Expression wurden Proben des Überstandes (1 ml) mit 10 % TCA gefällt und die rekombinanten Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE unter reduzierenden (+DTT) bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) mit einem anti-His₆-Antikörper im Immunblot detektiert.

5.2 Rekombinante Expression der katalytischen Domäne

5.2.1 Herstellung von Cysteinvarianten

5.2.1.1 Austausch der Cysteinreste C145 und C154 durch Mutagenese

Um den Einfluss der potenziell freien Cysteine C145 und C154 (Abb. 5.1-1) auf die Aggregatbildung bei der Expression der reifen Form der Tryptase γ zu untersuchen, wurden sie einzeln bzw. gemeinsam mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ersetzt (Abb. 5.2-1). Dazu wurden mit Hilfe des Programms *Quick Change Primer Design* Primer entworfen, die an zentraler Stelle das für Alanin (GCC) anstatt des für Cystein (TGC) kodierenden Tripletts enthalten. Diese Primer wurden in einer PCR mit dem Plasmid pPICZ α A-rTy Δ C als Template eingesetzt. Anschließend wurden die Template-Plasmide, die aus *E. coli* isoliert worden waren und deshalb methyliert vorliegen, mit dem Restriktionsenzym DpnI abgebaut. Die mutierten Amplikons wurden zur Transformation von superkompetenten *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet, die anschließend auf zeocinhaltigem (25 μ g/ml) LB-Agarmedium ausgestrichen wurden; das entsprechende Resistenzgen ist im Expressionsvektor pPICZ α A vorhanden. Einzelne Kolonien wurden in LB-Zeocin-Medium angezogen, die Plasmide isoliert und anschließend sequenziert. Die DNA-Sequenzierung verifiziert die erfolgreichen Nukleotidaustausche in allen drei Konstrukten, die Translation zeigt den Cystein/Alanin-Austausch an den gewünschten Positionen (Abb. 5.2-2).

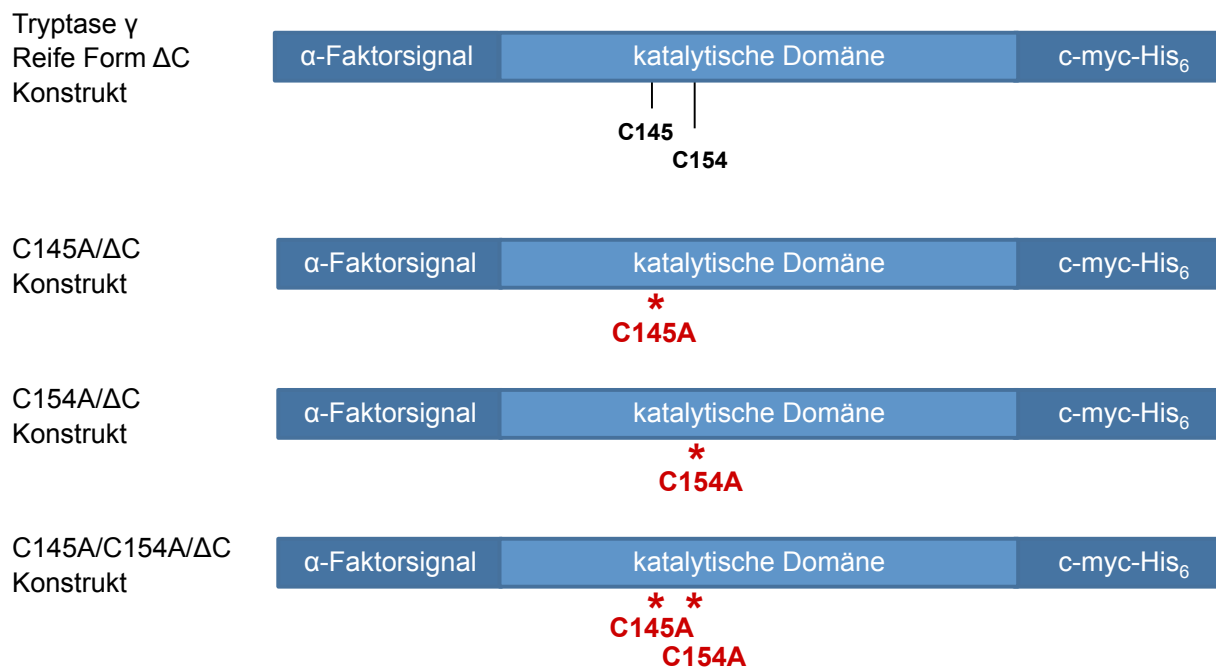


Abb. 5.2-1: Konstrukte zur Expression von Cysteinmutanten der Tryptase γ . Die potenziell freien Cysteinreste 145 und 154 wurden einzeln bzw. gemeinsam durch Alanin ersetzt.

A

NM_012467	411	CTCTCCAGCC	GGATCCTGCC	CGTCTGCCTC	CCGGAGGCCT	CAGATGACTT	CTGCCCTGGG	ATCCGGTGCT	480
C145A	GC....	
C154A	GC.....	
C145A/C154A	GC....GC.....	

B

NP_036599	111	ILHSSPSGQP	GTSGDIALVE	LSVPTLSSR	ILPVCLPEAS	DDFCPGIRCW	VTGWGYTREG	EPLPPPYSLR	180
C145A	A....	
C154A	A....	
C145A/C154A	A....A....	

Abb. 5.2-2: Sequenzierung der Expressionskonstrukte Tryptase γ -C145A, -C154A und -C145A/C154A. A) Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz. B) Translation der Sequenz. Die Aminosäuresequenz zeigt den Austausch der Cysteinreste 145 bzw. 154 gegen Alanin.

5.2.1.2 Transformation von *P. pastoris* und Selektion von Stämmen

Nach der Mutagenese und Verifizierung der drei Plasmide pPICZ α A-rTy Δ C-C145A, pPICZ α A-rTy Δ C-C154A und pPICZ α A-rTy Δ C-C145A/C154A durch Sequenzierung wurden sie zur Transformation von *P. pastoris* verwendet. Um die Zellen des *P. pastoris*-Wirtsstammes X33 für die Elektroporation kompetent zu machen, wurden sie in YPD-Medium bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 1 - 1,3 kultiviert, mit kaltem Wasser gewaschen, in 1 M Sorbitol aufgenommen und durch Zentrifugation um den Faktor 250 konzentriert. Parallel dazu wurden die oben genannten Plasmide mit dem Restriktionsenzym PmeI linearisiert, das eine Schnittstelle in der 5' AOX1 Promotorregion erkennt. Nach Hitzeinaktivierung von PmeI wurden die linearisierten Plasmide durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolfällung isoliert. Schließlich wurden die elektrokompenten *Pichia*-Zellen mit der isolierten DNA versetzt, kurz inkubiert und im GenePulser™ elektroporiert. Nach einstündiger Inkubation in 1 M Sorbitollösung (30°C) und dreistündiger Inkubation in YPD-Medium wurden die Ansätze auf zeocinhaltigen YPDS-Platten ausgestrichen. Um eine multiple Integration der Plasmide zu favorisieren, die unter Umständen mit einer erhöhten Ausbeute der Zielproteine und einer erhöhten Resistenz einhergeht, wurden ansteigende Zeocinkonzentrationen (100, 500 und 1000 µg/ml) verwendet. Das Wachstum von Kolonien (Tab. 5.2-1) auf allen YPDS-Platten nach 48-stündiger Inkubation bei 30°C zeigt die erfolgreiche Integration der DNA in die *Pichia*-Zellen. Bei der niedrigeren Zeocinkonzentration von 100 µg/ml wurden zahlreiche Kolonien beobachtet (> 85), bei höheren Konzentrationen (500 und 1000 µg/ml) dagegen deutlich weniger (< 10).

Tab. 5.2-1: Einfluss von Zeocin auf die Kolonienzahl nach Transformation von *P. pastoris* und 48-stündiger Inkubation.

Konstrukt	Zeocinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]		
	100	500	1000
Anzahl der Kolonien			
pPICZ α A-rTy Δ C-C145A	356	3	1
pPICZ α A-rTy Δ C-C154A	85	3	2
pPICZ α A-rTy Δ C-C145A/C154A	197	7	2

Um transformierte *Pichia*-Stämme mit hoher Expressionsausbeute zu identifizieren, wurden Testexpressionen im 10 ml-Maßstab durchgeführt. Dazu wurden bis zu acht Stämme jedes der drei Konstrukte in Vollmedium angeimpft und über drei Tage in methanolhaltigem Vollmedium kultiviert. Anschließend wurde Tryptase γ im Überstand der Kulturen mit Hilfe der Dot-Blot-Methode mit einem anti-Tryptase γ Antikörper nachgewiesen (Abb. 5.2-3). In *E. coli* hergestellte Tryptase γ diente als Mengenstandard, der nicht-transformierte *P. pastoris*-Stamm X33 als Negativkontrolle (NK) und zwei rTy Δ C-exprimierende Stämme (rTy Δ C-X33) als Positivkontrolle (PK). In den Überständen aller Stämme konnte Tryptase γ nachgewiesen werden, jedoch in unterschiedlichen Mengen. Die Stämme mit der höchsten Expressionsausbeute (in Abb. 5.2-3 rot markiert) wurden für die weiteren Expressionsversuche ausgewählt.

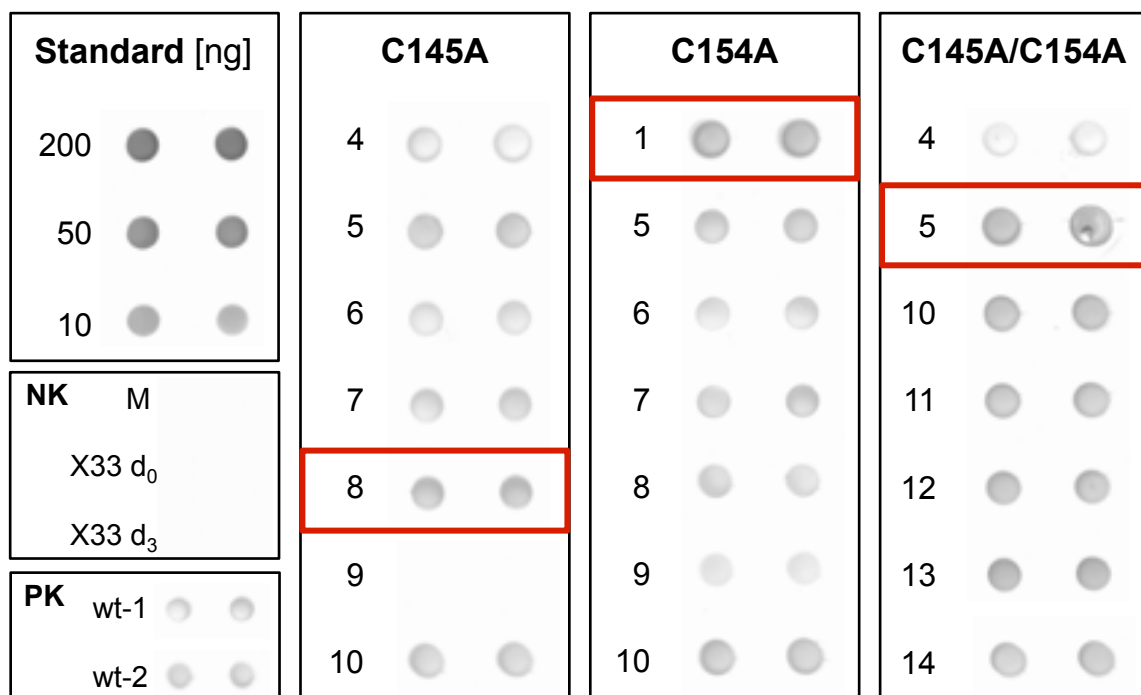


Abb. 5.2-3: Bestimmung der Expressionsausbeute von *Pichia*-Stämmen nach Transformation mit pPICZ α A-rTy Δ C-C145A, -C154A und -C145A/C154A mittels Dot Blot-Analyse. In *E. coli* hergestellte Tryptase γ dient als Mengenstandard. Als Negativkontrolle (NK) wurde der nicht-transformierte *P. pastoris*-Stamm X33 zum Zeitpunkt Tag 0 (d_0) und Tag 3 (d_3), als Positivkontrolle (PK) wurden zwei rTy Δ C-exprimierende Stämme (wt-1, wt-2; Tag 3) verwendet.

5.2.1.3 Analyse der Expression und der Aggregatbildung mittels Immunblot

Um die Expression und die Aggregatbildung der drei rTyΔC-Cysteinvarianten zu untersuchen, wurden Testexpressionen mit den hinsichtlich der Expressionsausbeuten ausgewählten Stämmen (s. 5.2.1.2) durchgeführt. Als Kontrollen wurden Stämme, die die Wildtypform und das Zymogen exprimieren, mitgeführt. Die Expressionsstämme wurden über drei Tage in methanolhaltigem Vollmedium (500 ml) kultiviert, Proben der Überstände entnommen und die rekombinanten Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen (\pm DTT) im Immunblot mit einem anti-c-myc-Antikörper detektiert. Unter reduzierenden Bedingungen (+DTT) sind alle Varianten mit unterschiedlicher Bandenintensität bei einem Molekulargewicht zwischen 30 und 40 kDa zu sehen (Abb. 5.2-4). Dagegen sind unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) nur das Zymogen und die rTyΔC-C145A/C154A-Variante als Banden mit ähnlicher Masse nachweisbar, die Wildtypform und die Einzelmutanten laufen bei einem apparentem Molekulargewicht > 220 kDa. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Cysteinreste in die Aggregatbildung involviert sind und dass die Mutagenese beider Cysteine zu Alanin zu einer Reduzierung der Aggregatbildung führt, während die Mutagenese einzelner nicht ausreicht.

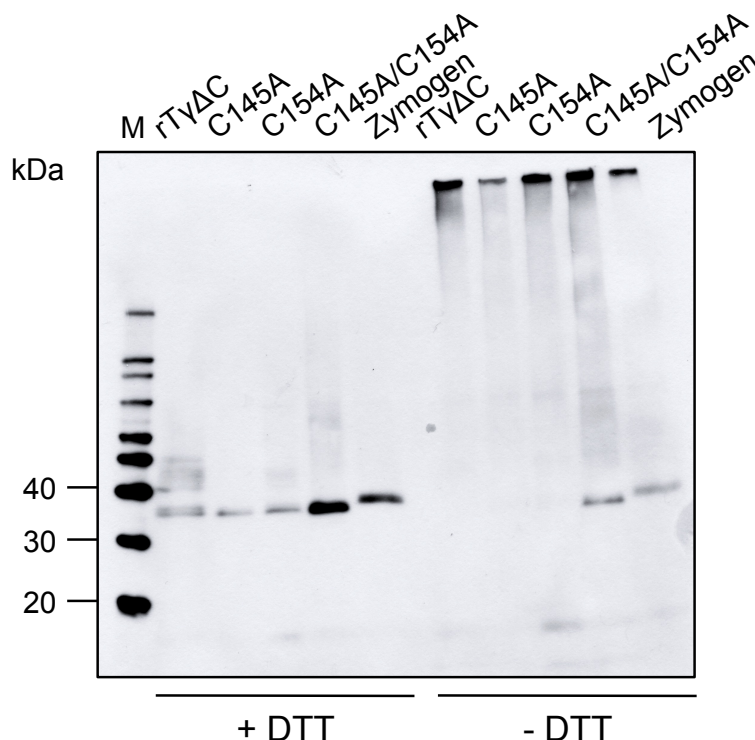


Abb. 5.2-4: Analyse der Aggregatbildung der Tryptase γ -Cysteinvarianten. Nach der rekombinanten Expression aller Tryptase γ -Varianten über drei Tage im Schüttelkolben wurden Proben (10 μ l) unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE getrennt. Die rekombinanten Proteine wurden mittels Immunblot mit einem Maus anti-c-myc-Antikörper detektiert. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen sind nur das Zymogen und die rTyΔC-C145A/C154A-Variante als nicht aggregierte Proteine mit einer apparentem Molekularmasse von 30 - 40 kDa detektierbar.

5.2.1.4 Analyse der Expression mittels Quantifizierung der enzymatischen Aktivität

Um funktionelle, enzymatisch aktive rTyΔC im Hefeüberstand nachzuweisen, wurde deren Aktivität mittels fluorogener Peptidsubstrate quantifiziert. Für den Ansatz wurden Proben (50 µl) der Überstände aus den Testexpressionen der selektierten Expressionsstämme (s. 5.2.1.2) sowie rekombinante Tryptase β (100 pM) als Kontrolle mit verschiedenen Peptidsubstraten (Endkonzentration jeweils 5 µM) eine Stunde bei 37°C in TT-Puffer mit 50 µg/ml Heparin inkubiert. Die Abspaltung des Fluorophors AMC wurde im Fluorimeter HTS7000 bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm verfolgt. Die Aktivität [U] der Protease mit einem Substrat ergibt sich aus der Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit.

Die Messung der enzymatischen Aktivität (Abb. 5.2-5) zeigt, dass die rTyΔC-Varianten das Substrat Z-Phe-Arg-AMC gegenüber den typischen Substraten der Tryptase β bevorzugen. Dabei weist die rTyΔC-C145A/C154A im Vergleich zu rTyΔC-C145A, -C154A und der Wildtypform die höchste Aktivität gegenüber Z-Phe-Arg-AMC auf (rTyΔC-C145A/C154A > -C154A > -C145A > -wt). Die Höhe der Aktivität korreliert mit der Bandenintensität und invers mit der Aggregatbildung, die im Immunblot (Abb. 5.2-4) beobachtet wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Expressionsstamm rTyΔC-C145A/C154A zu einer nicht-aggregierten, sezernierten und enzymatisch aktiven Tryptase γ-Variante führt – im Folgenden rhTryptase γ genannt –, so dass dieser *Pichia*-Stamm für die folgenden Expressionen verwendet wurde.

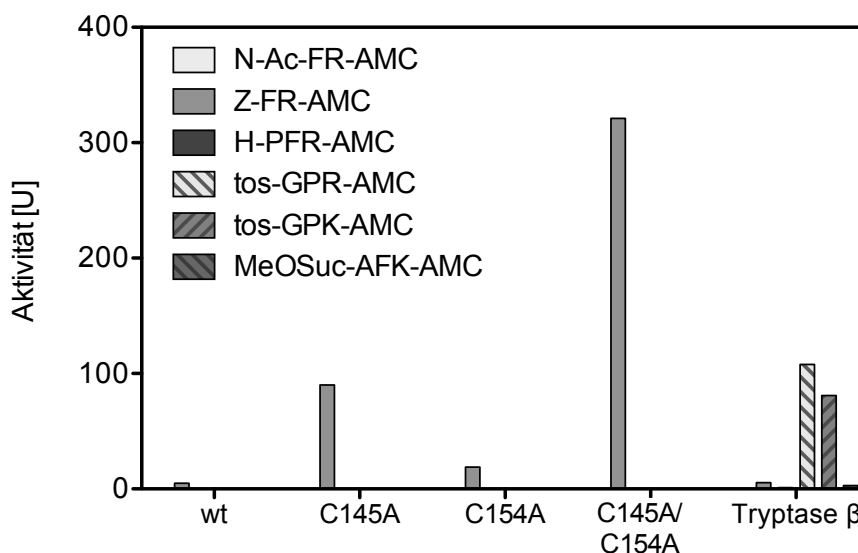


Abb. 5.2-5: Bestimmung der enzymatischen Aktivität der rTyΔC-Cysteinvarianten mit verschiedenen Substraten. Nach dreitägiger Testexpression (10 ml) wurde die enzymatische Aktivität in Proben (50 µl) der Überstände mit fluorogenen Peptidsubstraten (5 µM) über 1 h bei 37°C gemessen. Tryptase β (100 pM) diente als Kontrolle.

5.2.2 Wahl des Expressionssystems

5.2.2.1 Umklonierung in den konstitutiven Expressionsvektor pGAPZαA

Um den Einfluss des Expressionssystems auf die Expression und die Aggregatbildung zu untersuchen wurden die bisherigen Expressionskonstrukte aus dem Vektor pPICZαA in den Vektor pGAPZαA umkloniert. Im Gegensatz zum Vektor pPICZαA mit dem Methanol-induzierbaren Promotor der Alkoholoxidase (AOX1) steht die Expression im Vektor pGAPZαA unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Promotors der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH).

Für die Umklonierung wurden die Plasmide pPICZαA-rTyΔC-C145A, -C154A und -C145A/C154A mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI geschnitten, die Ansätze mittels Gelelektrophorese (Abb. 5.2-6) aufgetrennt und die Expressionskonstrukte (746 nt) aus dem Agarosegel isoliert. Analog wurde der Vektor pGAPZαA linearisiert und somit komplementäre Enden für die anschließende Ligation generiert.

Für die Ligation wurden die drei isolierten Expressionskonstrukte mit dem linearisierten pGAPZαA-Vektor (ca. 3060 bp) und T4-DNA-Ligase eine Stunde bei 16°C inkubiert. Der Erfolg der Ligation bzw. der Umklonierung wurde durch Restriktionsanalyse mit SapI und XbaI überprüft; diese Enzyme schneiden aus den pGAPZαA-Konstrukten ein Fragment mit 1231 nt aus, während sie die pPICZαA-Konstrukte lediglich linearisieren. In der Gelelektrophorese (Abb. 5.2-7) ist bei allen drei pGAPZαA-Konstrukten eine Bande bei etwa 1200 bp und < 3000 bp zu erkennen, jedoch nicht bei denen im ursprünglichen pPICZαA-Plasmid. Anschließend wurden die Konstrukte auch durch Sequenzierung verifiziert.

Die so generierten Plasmide wurden anschließend für die Transformation von *P. p.* X33 (s. a. 5.2.1.2) verwendet. In Testexpressionen wurden mehrere Stämme jedes Konstrukts in

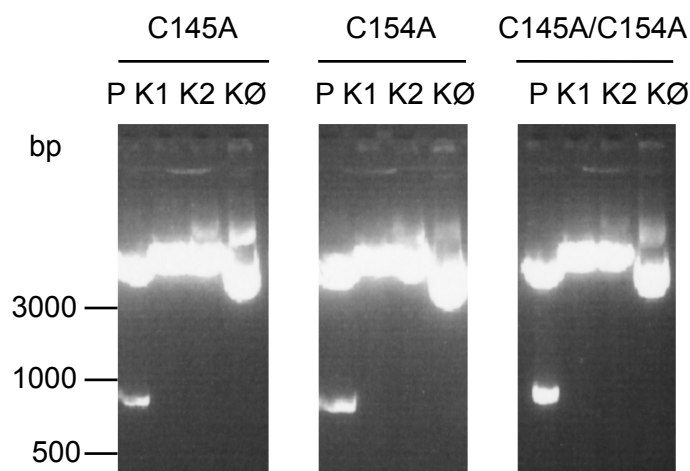


Abb. 5.2-6: Gelelektrophorese der Plasmide der rTyΔC-Cysteinvarianten nach Restriktionsverdau. Nach Inkubation der Plasmide mit beiden (P), einem (K1, K2) bzw. ohne (KØ) Restriktionsenzym wurden die Produkte im Agarosegel aufgetrennt. Nur nach Inkubation mit beiden Restriktionsenzymen ist ein Produkt bei ca. 750 bp sichtbar.

glycerinhaltigem Vollmedium (10 ml) über drei Tage kultiviert und die mit den höchsten Expressionsausbeuten mittels Dot Blot-Analyse (s. a. 5.2.1.2) für die folgenden Expressionsstudien ausgewählt.

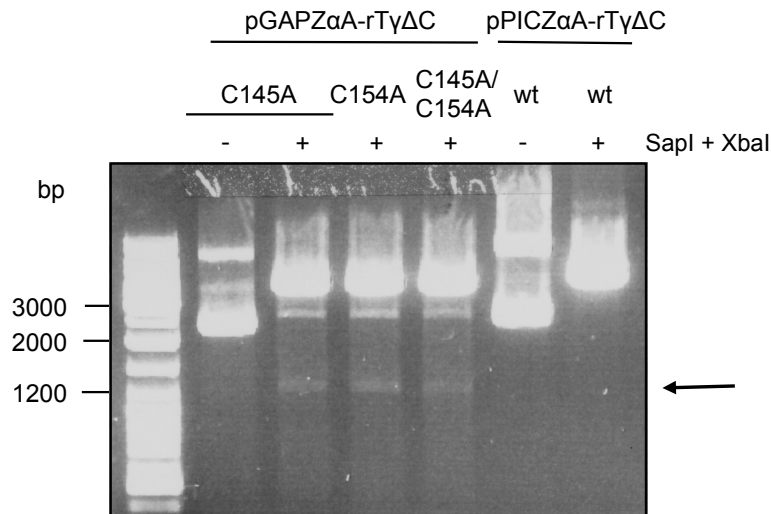


Abb. 5.2-7: Restriktionsanalyse der rTyΔC-Konstrukte im Vektor pGAPZαA. Die als Kontrollen verwendeten, ungeschnittenen Plasmide (-) zeigen die typischen zwei Banden eines zirkulären Plasmids. Die mit den Restriktionsenzymen behandelten Konstrukte zeigen jeweils eine Bande bei 4000 bp, < 3000 bp und bei 1200 bp (Pfeil), die die korrekte Ligation bestätigen.

5.2.2.2 Vergleich der Expressionssysteme hinsichtlich Expressionsausbeute und Aggregatbildung

Um den Einfluss des Expressionsvektors bzw. des konstitutiv und des induzierbaren Promotors auf die Expressionsausbeuten der rTyΔC-Cysteinvarianten der Tryptase γ zu untersuchen, wurden Testexpressionen durchgeführt. Dazu wurden die pGAPZαA-Stämme drei Tage bei 30°C in Vollmedium kultiviert. Die pPICZαA-Stämme wurden dagegen in Vollmedium hochgezogen, in methanolhaltiges Medium (1 %; BMMY) überführt und drei Tage kultiviert. Die mit den verschiedenen Stämmen erzielten Expressionsausbeuten wurden über die enzymatische Aktivität der funktionellen rTyΔC in den Überständen am Tag drei quantifiziert (Abb. 5.2-8). Bei allen Cysteinvarianten ist deren enzymatische Aktivität nachweisbar, im Überstand des Expressionsstamms rTyΔC-C145A/C154A ist sie jedoch gegenüber den beiden Einzelmутanten deutlich höher. Die Expressionsausbeuten der rTyΔC-C145A/C154A mit dem konstitutiven Promotor im Vergleich zum induzierbaren Expressionssystem unterscheiden sich dagegen nur um den Faktor 1,2. Daraus ergibt sich, dass mit dem Stamm rTyΔC-C145A/C154A-X33 die höchsten Expressionsausbeuten an funktioneller rTyΔC erzielt werden und dass der Expressionsvektor nur einen geringeren Einfluss hat. Da die Steuerung der rekombinanten Expression mit dem pPICZαA Vektor gezielter verläuft, wurde dieser für die rekombinante Herstellung der katalytischen Domäne der Tryptase γ gewählt.

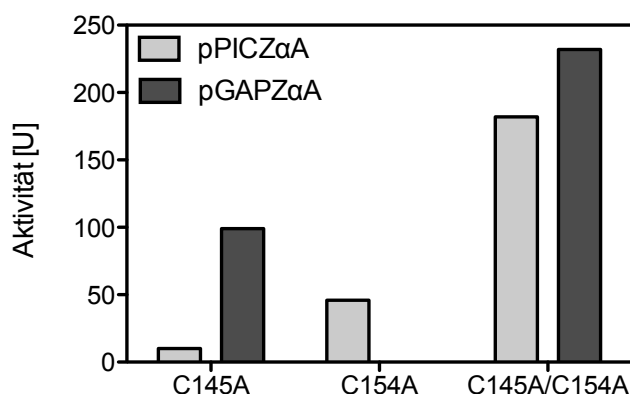


Abb. 5.2-8: Testexpression der rTyΔC-Cysteinmutanten in den Vektoren pPICZαA und pGAPZαA. Nach dreitägiger Testexpression (10 ml) wurde die enzymatische Aktivität [U] in Proben (50 µl) der Überstände mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC (10 µM) über 10 min bei 37°C gemessen.

5.2.3 Expression in verschiedenen Wirtsstämmen

Da der zur heterologen Expression verwendete Wirtstamm die Expressionsausbeute wesentlich beeinflussen kann, wurden im Rahmen der Optimierung verschiedene *P. pastoris*-Wirtsstämme (Tab. 5.2-2) verglichen. Neben dem Wildtypstamm X33, der aufgrund der beiden Gene *AOX1* und *AOX2* einen Mut⁺-Phänotyp (*methanol utilization plus*) aufweist und gut in Gegenwart von Methanol wächst, wurden die Expressionen in den Wirtsstämmen GS115, KM71 und SMD1168 untersucht. Der Stamm GS115 kann Methanol wie der Wildtypstamm umsetzen (Mut⁺), trägt jedoch eine Mutation im *HIS4*-Gen (*his4*) und ist im Phänotyp His⁻, benötigt also Histidin für das Wachstum; diese Eigenschaft kann mit *HIS4*-positiven Vektoren zur Selektion dienen. Der Stamm KM71 trägt zusätzlich zur Mutation im *HIS4*-Gen eine Deletion im *AOX1*-Gen, sodass die Metabolisierung des Methanols vom Genprodukt des schwächeren *AOX2*-Gens abhängt; der Stamm wächst deshalb in der Gegenwart von Methanol nur langsam (Mut^S). Der Stamm SMD1168 hat den Vorteil, dass er Protease A-defizient ist und heterologe Proteine daher potenziell langsamer degradiert werden.

Tab. 5.2-2: Genotypen und Eigenschaften der verwendeten *P. pastoris*-Wirtsstämme

Stamm	Genotyp	Phänotyp
X33	Wildtyp	Mut ⁺ His ⁺
GS115	<i>his4</i>	Mut ⁺ His ⁻
KM71	<i>his4, aox1::ARG4, arg4</i>	Mut ^S His ⁻
SMD1168	<i>his4, pep4</i>	Mut ⁺ His ⁻ Protease A-defizient

Zunächst wurden die verschiedenen Wirtsstämme mit dem Plasmid pPICZαA-rTyΔC-C145A/C154A (s. a. 2.2.2.3) transformiert und Expressionsstämme mittels Dot Blot-Analyse und Bestimmung der enzymatischen Aktivität ausgewählt (s. a. 2.2.5.5). Diese selektionierten Stämme wurden anschließend in Testexpressionen über drei Tage mit Methanol induziert und die Expressionsausbeuten der rhTryptase γ im Überstand mittels Immunblot mit einem anti-His₆-Antikörper und Quantifizierung der enzymatischen Aktivität verglichen. Im Immunblot (Abb. 5.2-9A) ist die rhTryptase γ als Hauptbande bei einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa im Überstand aller Stämme detektierbar. Anhand der Bandenintensitäten sind die Expressionsausbeuten bei den Wirtsstämmen X33 und KM71 ähnlich, bei dem Wirtsstamm SMD1168 etwas höher und bei dem Wirtsstamm GS115 deutlich niedriger. Bei der Analyse der enzymatischen Aktivität (Abb. 5.2-9B) fallen vor allem die hohen Aktivitäten im Überstand der beiden Wirtsstämme X33 und KM71 auf, die deutlich höher sind als bei den beiden anderen Stämmen. Da mit dem Wirtsstamm X33 eine relativ gute Expression beobachtet wurde und dieser Stamm für die Fermentation in einem einfachen Medium geeignet ist, wurde er für die weiterführende präparative Expression gewählt.

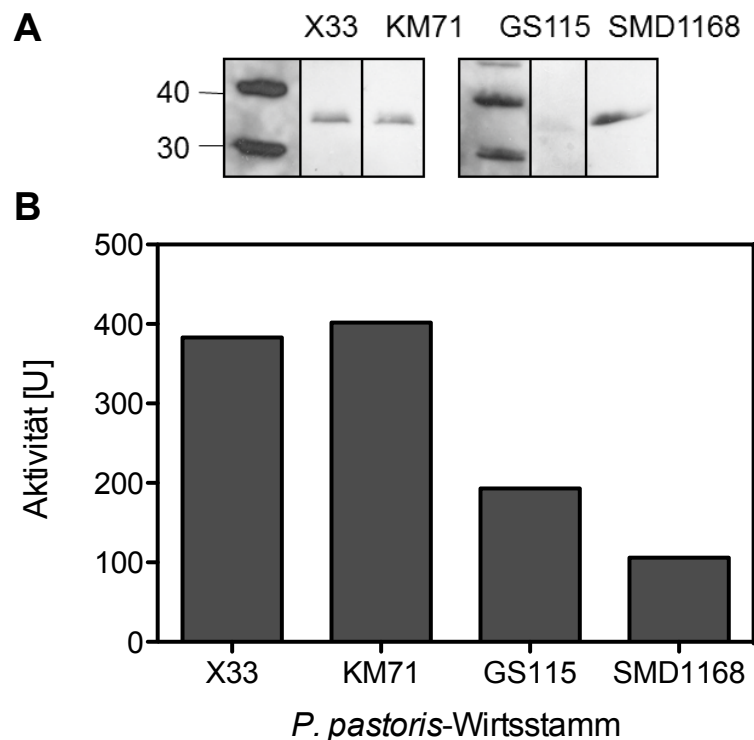


Abb. 5.2-9: Analyse der Expressionsausbeute in verschiedenen *P. pastoris*-Wirtsstämmen. **A)** Die Proteine wurden nach dreitägiger Expression aus dem Überstand (1 ml) gefällt, Proben mittels SDS-PAGE getrennt und die rhTryptase γ mittels Immunblot mit einem anti-His₆-Antikörper detektiert. **B)** Nach dreitägiger Testexpression wurde die enzymatische Aktivität [U] der rhTryptase γ in Proben der Überstände mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC (10 μM) quantifiziert.

5.2.4 Optimierung und 'Upscaling'

5.2.4.1 Verlauf der Expression im Schüttelkolben

Im Rahmen der Optimierung der Expression der rhTryptase γ wurden die Akkumulation des funktionellen Proteins und die Bildung von Degradierungsprodukten zunächst im Schüttelkolben untersucht. Dazu wurde der Expressionsstamm rTy Δ C-C145A/C154A-X33 im kleinen Maßstab (10 ml) angezogen und anschließend unter Zugabe von Glycerin (1 %) im Schüttelkolben (500 ml) bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von etwa 3 kultiviert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Expression durch Zugabe von Methanol (1 %) alle 24 h über vier Tage induziert. Der Verlauf der Expression wurde mittels Immunblot (Abb. 5.2-10) mit den anti-His₆- und anti-Tryptase γ -Antikörpern sowie über die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität (Abb. 5.2-11) verfolgt.

Der anti-His₆-Immunblot zeigt, dass die Intensität der Hauptbande bei einer Molekülmasse von 35 kDa über vier Tage ansteigt, die rhTryptase γ also über diese Zeit im Hefeüberstand akkumuliert. Die Detektion mit dem anti-Tryptase γ -Antikörper zeigt ebenfalls die Zunahme der Hauptbande, jedoch gleichzeitig die Akkumulation von Degradierungsprodukten insbesondere ab Tag 3.

Die Messung der Gesamtaktivität (U) (Abb. 5.2-11) korreliert mit den Ergebnissen der Immunblots und zeigt einen Anstieg über die Zeit, der ab Tag drei etwas geringer wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die rhTryptase γ durch Kultivierung des Expressionsstammes rTy Δ C-C145A/C154A-X33 im Schüttelkolben über drei Tage im Überstand akkumuliert und dass ab Tag vier die Bildung von Degradierungsprodukten zunimmt. Deshalb wurde in folgenden Versuchen die Expression auf drei Tage begrenzt.

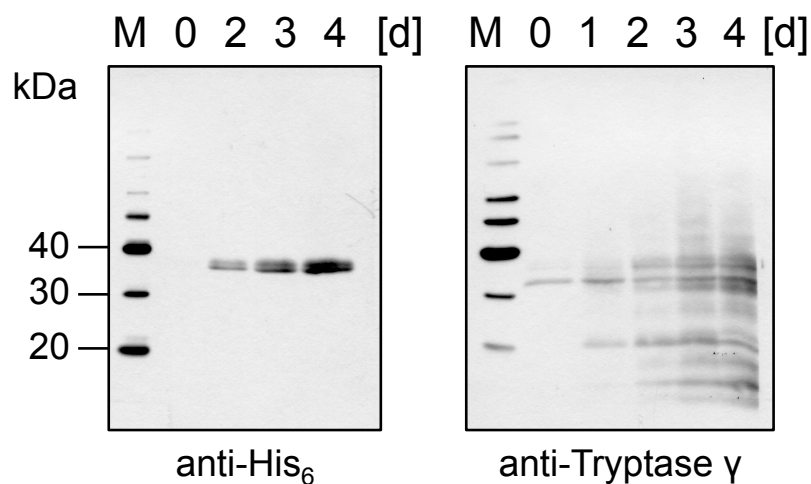


Abb. 5.2-10: Analyse der rekombinanten Expression der rhTryptase γ im Schüttelkolben. An den Tagen 0-4 der Expression wurden Proben (1 ml) des Überstands entnommen, mit 10% TCA gefällt und mittels SDS-PAGE getrennt. Die rekombinante Tryptase γ wurde mittels Immunblot mit anti-His₆- bzw. anti-Tryptase γ -Antikörpern detektiert. M Proteinmarker.

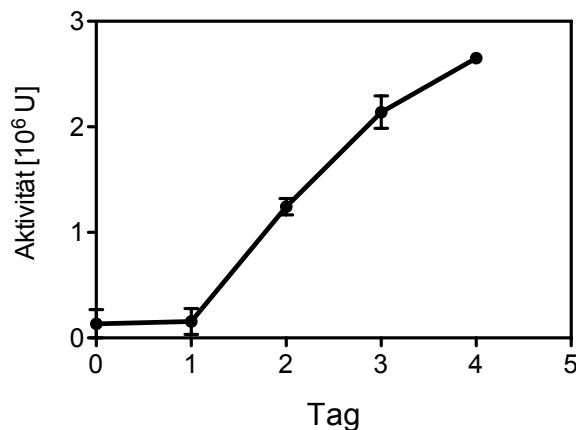


Abb. 5.2-11: Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der rhTryptase γ im Verlauf der Expression im Schüttelkolben. Während der Expression wurde die Aktivität der rhTryptase γ in Proben (50 μ l) des Überstands täglich mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC (10 μ M) gemessen. Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$.

5.2.4.2 Präparative Fermentation im Bioreaktor

Zur präparativen Expression der rhTryptase γ wurde die Fermentation vom Schüttelkolben in einen Bioreaktor mit einem Volumen von 5 l überführt. Im Bioreaktor erfolgt die Fermentation in einem dreischrittigen Prozess (Abb. 5.2-12): In der ersten Phase wird die Hefe in glycerinhaltigem (1 %) Vollmedium kultiviert und Zellmasse (ca. 100 g/l) generiert, die durch weitere Zugabe von Glycerin (ca. 1 %/h* l bzw. 8 ml/h* l) in der zweiten Phase (Fütterungsphase) weiter vermehrt wird (bis ca. 300 g/l). Die heterologe Expression der rhTryptase γ wird schließlich in der dritten Phase durch Zugabe von Methanol in steigender Menge (< 0,4 - 3 %/h* l bzw. 3 - 30 ml/h* l) induziert. Dabei wird der Sauerstoffgehalt in der Kultur, der kontinuierlich über den Partialdruck des gelösten Sauerstoffs (pO_2) gemessen wird, auf einen pO_2 -Wert von 32 - 35 % geregelt. Da der Metabolismus der Kohlenstoffquellen, Glycerin bzw. Methanol, Sauerstoff verbraucht, erfolgt die Regelung durch Erhöhung der Drehzahl sowie der Luftzufuhr und gegebenenfalls durch verminderte Zugabe der Kohlenstoffquelle.

Der Verlauf der Fermentation wurde über das Nassgewicht der Zellmasse, die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ und Immunblots verfolgt. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde die Fermentation nach drei Tagen beendet. Die Bestimmung des Nassgewichts (Abb. 5.2-12) zeigt einen Anstieg der Zellmasse von ca. 30 g/l auf 100 g/l in der Glycerin-*Batch*-Phase und weiter auf ca. 300 g/l in der Glycerin-Fütterungsphase. Während der anschließenden Methanol-Fütterungsphase bleibt die Zellmasse weitgehend konstant. Die Messung der enzymatischen Aktivität der rhTryptase γ im Überstand der Hefekultur zeigt eine Zunahme der sezernierten Protease über die Zeit. Zu Beginn der Induktion (0 h) wurde eine basale Aktivität von etwa $60 \cdot 10^6$ U gemessen, die über die Zeit

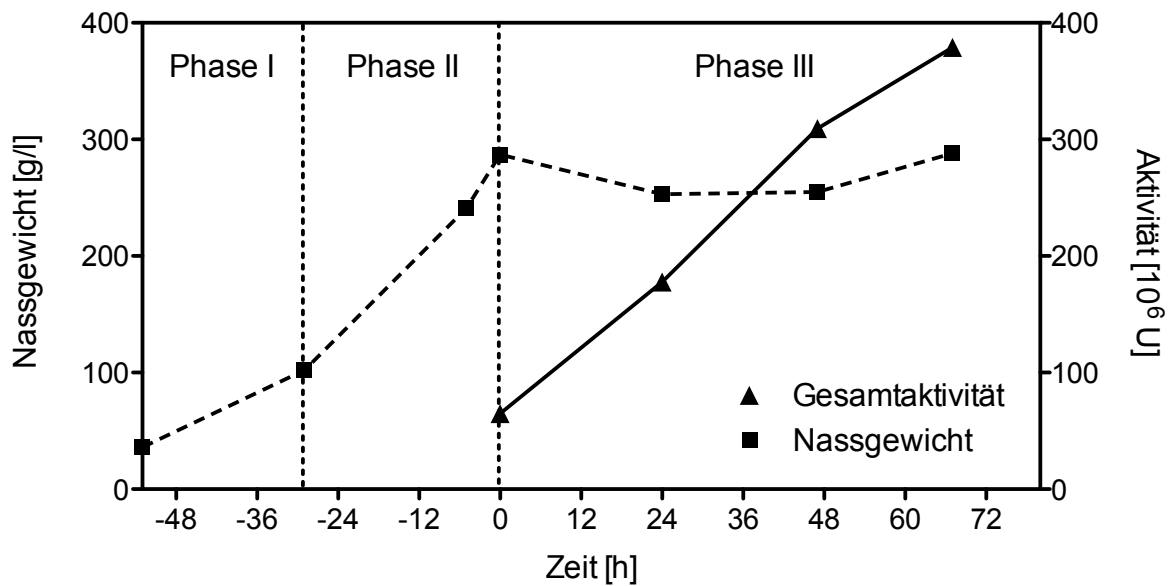


Abb. 5.2-12: Verlauf der Expression der rhTryptase γ im Bioreaktor. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und das Nassgewicht der Hefe gemessen. Während der Induktion mit Methanol wurde die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ in den Proben ($10 \mu\text{l}$) des Hefeüberstands gemessen.

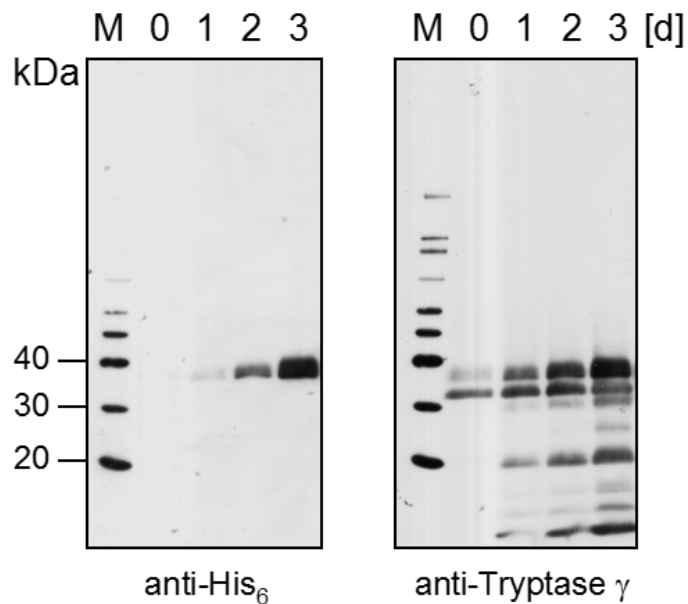


Abb. 5.2-13: Analyse der rekombinanten Expression der rhTryptase γ im Bioreaktor. Während der Fermentation über drei Tage im Vollmedium wurden täglich Proben ($10 \mu\text{l}$) des Überstands genommen, anschließend mittels SDS-PAGE getrennt und rhTryptase γ mittels Immunblot mit einem anti-His₆- und einem anti-Tryptase γ -Antikörper detektiert.

auf bis zu $380 \cdot 10^6$ U nach 68 h ansteigt. Bei der Analyse des Expressionsverlaufs mittels Immunblot mit dem anti-His₆-Antikörper (Abb. 5.2-13) ist anhand der steigenden Bandenintensität bei etwa 35 kDa die Akkumulation der rhTryptase γ im Hefeüberstand über die Zeit zu sehen. Gleichzeitig ist mit Hilfe des anti-Tryptase γ -Antikörpers auch die Zunahme der Degradierungsprodukte zu beobachten. Der Verlauf der Fermentation im Bioreaktor sowie die Akkumulation der rhTryptase γ und die Bildung von Degradierungsprodukten entsprechen damit weitgehend dem Verlauf der Expression im Schüttelkolben (Abb. 5.2-10).

5.2.4.3 Einfluss des Kulturmediums und Reproduzierbarkeit der Fermentation

Um den Einfluss des Kulturmediums auf die Expressionsausbeute der rhTryptase γ und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der Fermentation im Bioreaktor zu untersuchen, wurden mehrere Fermentationen im bisher verwendeten Vollmedium sowie in Minimalmedium durchgeführt. Dafür wurde die rhTryptase γ jeweils analog der Fermentation im bisherigen Vollmedium (s. a. 5.2.4.2) über drei Tage in Voll- bzw. Minimalmedium im Bioreaktor exprimiert. Die Expressionsausbeute der Fermentation wurde über die Messung der enzymatischen Aktivität am Tag drei bestimmt (Abb. 5.2-14). Daraus ergibt sich, dass die Expressionsausbeute im Vollmedium mit $440 \pm 110 \cdot 10^6$ U ($n=3$) gegenüber der Expression im Minimalmedium mit $25 \pm 8 \cdot 10^6$ U ($n=3$) etwa 20-fach höher liegt. Zudem bestätigen die unabhängigen Versuche die Reproduzierbarkeit des Fermentationsprotokolls und der erzielten Expressionsausbeuten. Daher wurde die rekombinante Expression der rhTryptase γ im Vollmedium bevorzugt, obwohl dieses komplexe Medium die anschließende Proteinaufreinigung deutlich erschwert.

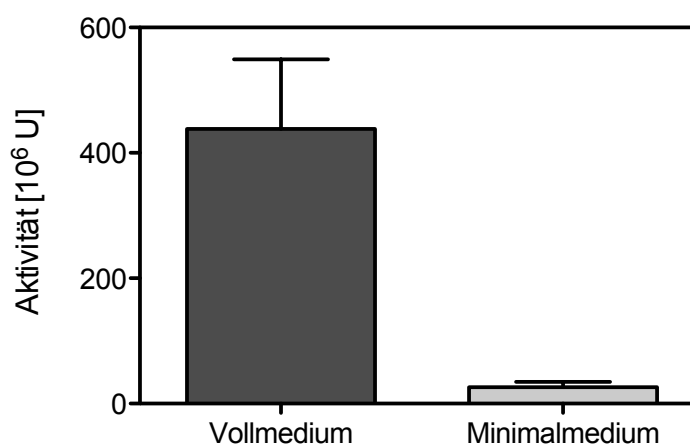


Abb. 5.2-14: Expressionsausbeuten der rhTryptase γ nach Fermentation in Voll- und Minimalmedium im Bioreaktor. Die Ausbeuten wurden über die Messung der enzymatischen Aktivität nach Ernte der Hefekultur am Tag 3 bestimmt. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$.

5.2.4.4 Bestimmung der Ausbeute

Der Vergleich der Ausbeuten der heterologen Expression der rhTryptase γ im 10 ml-, 500 ml- und 5 l-Maßstab veranschaulicht den Erfolg der Optimierung und der Hochskalierung (Tab. 5.2-3). Anhand der Aktivität pro ml wird deutlich, dass die Überführung vom 10 ml-Maßstab zum Schüttelkolben zuerst zu einer Reduktion der Ausbeute um den Faktor 2 und erst die Überführung in den Bioreaktor zur Zunahme um den Faktor 12 führt. Durch die Hochskalierung von 10 ml auf 500 ml bzw. 3300 ml wird das Volumen deutlich vergrößert, das die Kultivierung einer höheren Biomasse erlaubt. In der Gesamtaktivität führt dies vom 10 ml-Maßstab ($100 \pm 3 \cdot 10^3$ U) zum Schüttelkolben ($2200 \pm 200 \cdot 10^3$ U) und zum Bioreaktor ($440 \pm 110 \cdot 10^6$ U) zu einer 20- bzw. 200-fachen Zunahme. Insgesamt wurde durch die Überführung vom 10 ml-Maßstab bis zum Bioreaktor die Ausbeute um den Faktor 4000 erhöht.

Tab. 5.2-3: Vergleich der Ausbeuten der rhTryptase γ bei Expression im 10 ml-Maßstab, Schüttelkolben (0,5 l) und Bioreaktor (5 l). Nach dreitägiger Expression wurde die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ in Proben des Überstands gemessen und pro ml sowie auf das gesamte Volumen berechnet. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$.

	Volumen [ml]	Aktivität [U/ml]	Gesamtaktivität [10^6 U]	Anzahl [n]
10 ml	10	10600	$0,1 \pm 0,004$	3
Schüttelkolben	500	4500	$2,2 \pm 0,2$	4
Bioreaktor	3300	130000	440 ± 110	3

5.2.5 Isolierung und proteinchemische Charakterisierung der rhTryptase γ

Nach der Optimierung der rekombinanten Expression der rhTryptase γ wurde eine Methode zur Isolierung der Protease aus dem Hefeüberstand etabliert. Da durch die Klonierung der rTy Δ C in den pPICZ α A-Vektor ein C-terminaler His $_6$ -Tag in das Expressionskonstrukt eingeführt worden war, wurde zunächst die Ni-NTA-Affinitätschromatographie für die Isolierung evaluiert. Es zeigte sich jedoch, dass die rhTryptase γ nicht ausreichend an das Säulenmaterial gebunden wurde. Daher wurde eine vierschrittige, aus einer Kationenaustausch- und einer Benzamidin-Affinitätschromatographie sowie zwei Dialyseschritten bestehende Methode optimiert, mit der die rhTryptase γ mit adäquater Menge, Ausbeute und Reinheit aufgereinigt werden konnte.

5.2.5.1 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Zur Isolierung der rhTryptase γ aus dem Hefeüberstand sollte zunächst die Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet werden, bei der die Affinität des C-terminalen His $_6$ -Tags zu immobilisierten Ni $^{2+}$ -Ionen genutzt wird. Dazu wurde ein Aliquot des Hefeüberstands (50 ml) mit NaCl (Endkonz. 300 mM) und Imidazol (Endkonz. 5 mM) versetzt und nach Einstellung des pH auf 7,5 bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule (1,5 ml, 0,85 x 0,75 cm, h x r) aufgetragen. Anschließend wurden unspezifisch gebundene Proteine mit einem Puffer mit niedriger Imidazolkonzentration (5 und

5.2.5.2 Vierstufiges Aufreinigungsprotokoll für rhTryptase γ

5.2.5.2.1 Kationenaustauschchromatographie

Als Alternative zur Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde eine Aufreinigung mit zwei Chromatographie- und zwei Dialyseschritten etabliert. Für den ersten Schritt wurde eine Kationenaustauschchromatographie gewählt, die vergleichsweise einfach skalierbar ist, die Aufkonzentrierung großer Volumina erlaubt und im leicht sauren pH-Bereich möglich ist, in dem die rhTryptase γ stabil ist. Zunächst wurde der Fermentationsüberstand (3270 ml; s. a. 5.2.4.4) gegen den Bindungspuffer der Kationenaustauschchromatographie dialysiert, um den pH auf 5,75 und damit unterhalb des isoelektrischen Punkts der rhTryptase γ (pI 6,4) einzustellen. Gleichzeitig werden durch die Dialyse niedermolekulare basische Bestandteile des peptidreichen Vollmediums entfernt, die mit hoher Affinität an die Kationenaustauschmatrix binden und damit die Bindungskapazität für Proteine und die Trennleistung reduzieren. Anschließend wurde das Dialysat (3300 ml) auf eine Fractogel-Säule mit Sulphogruppen (SO_3^- , ca. 90 ml, 4,5 x 2,5 cm, h x r) bei 4°C aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Bindungspuffer von dem Säulenmaterial gewaschen und die rhTryptase γ anschließend mit einem Stufengradienten des salzhaltigen Elutionspuffers (2 M NaCl) von der stationären Phase eluiert. In den Fraktionen (je ca. 25 ml) wurden die Absorption A_{280} , die Leitfähigkeit und die enzymatische Aktivität bestimmt (Abb. 5.2-16).

Der Verlauf der Leitfähigkeit verdeutlicht den Anstieg der Salzkonzentration, die nach 150 ml (1,5 Säulenvolumen (CV)) etwa der des Elutionspuffers entspricht. Der parallele Verlauf der Absorption A_{280} und der enzymatischen Aktivität mit einem Maximum zwischen ca. 80 und 150 ml Elutionsvolumen zeigt, dass die rhTryptase γ mit der Majorität des Proteins eluiert

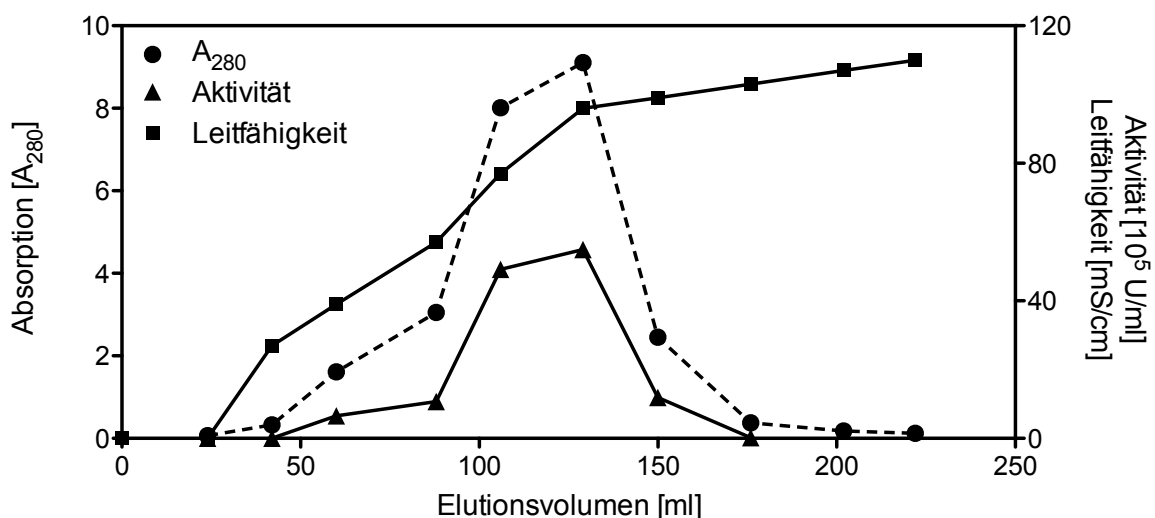


Abb. 5.2-16: Isolierung der rhTryptase γ mittels Kationenaustauschchromatographie. Nach der Chromatographie wurde in den Fraktionen die Absorption bei 280 nm, die Leitfähigkeit [mS/cm], und die enzymatische Aktivität [10⁵ U/ml] der rhTryptase γ bestimmt. Die rhTryptase γ eluiert bei 80 - 150 ml.

wird. Die Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. 5.2-17) zeigt in den Elutionsfraktionen eine prominente Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa (Pfeil), die im Auftrag nur schwach und den Durchlaufraktionen nicht zu sehen ist. Mittels Immunblot wurde verifiziert, dass diese Bande der rhTryptase γ entspricht (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der vereinigten Elutionsfraktionen unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) (Abb. 5.2-17) zeigt wie unter reduzierenden Bedingungen eine Hauptbande mit einer Molekülmasse von 35 kDa, Aggregate mit größerer Molekülmasse sind nicht zu erkennen.

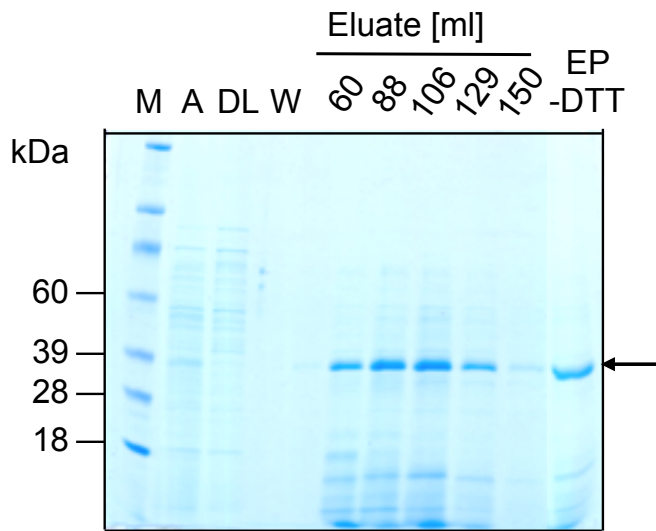


Abb. 5.2-17: Analyse der Isolierung der rhTryptase γ mittels Kationenaustauschchromatographie. Nach der Chromatographie wurden Proben (10 μ l) aus den Aufreinigungsschritten mittels SDS-PAGE getrennt und die Proteine mittels Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert die Position der rhTryptase γ bei etwa 35 kDa. EP Elutionspool.

5.2.5.3 Affinitätschromatographie an Benzamidin-Sepharose

Zur weiteren Aufreinigung der rhTryptase γ wurde eine Affinitätschromatographie mit Benzamidin-Sepharose gewählt. Benzamidin ist ein an das aktive Zentrum Trypsin-ähnlicher Serinproteasen bindender reversibler Inhibitor, der für die Affinitätschromatographie kovalent an stark quer-vernetzte 4 %-ige Agarose immobilisiert wurde. Für die Chromatographie wurde das Eluat der Kationenaustauschchromatographie 5:1 mit dem Auftragspuffer verdünnt und der pH auf 7,5 eingestellt. Ein Aliquot (25 % des Volumens, etwa 40 ml) wurde auf die Benzamidin-Sepharose (10 ml, 4,5 x 0,85 cm, h x r) aufgetragen; Vorversuche hatten gezeigt, dass die Säule etwa $0,5 \cdot 10^8$ U rhTryptase γ bindet und dass diese Kapazität nur für etwa ein Viertel der Fermentationsausbeute ausreichend ist. Nach dem Waschen der Sepharose mit dem Bindungspuffer wurde die rhTryptase γ mit einem Stufengradienten des benzamidinhaltigen (250 mM) Elutionspuffers eluiert. Da Benzamidin spektrophotometrische Absorptionsmessungen nahezu unmöglich macht, wurde der Verlauf der Elution über die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der rhTryptase γ verfolgt; dazu mussten die Proben um den Faktor 200 verdünnt werden, um die Inhibition durch den reversiblen Inhibitor

Benzamidin zu vermindern. Der Verlauf der enzymatischen Aktivität (Abb. 5.2-18, repräsentativ für alle vier Chromatographien) zeigt, dass rhTryptase γ bei 10 - 30 ml eluiert. Die Chromatographie wurde insgesamt viermal durchgeführt; die Peakfraktionen (je 14 - 20 ml) aller vier Chromatographien wurden vereinigt, zur Entfernung des Benzamidins gegen den Lagerungspuffer (1 M NaCl, pH 5,0) dialysiert, durch Ultrafiltration (Ausschlussgrenze 3 kDa) um den Faktor zwei aufkonzentriert und bei -80 °C gelagert.

Die Analyse der Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE (Abb. 5.2-19) zeigt in den Elutionsfraktionen eine prominente Bande mit einer Molekülmasse von ca. 35 kDa. Daneben sind nur einige schwache weitere Banden zu erkennen.

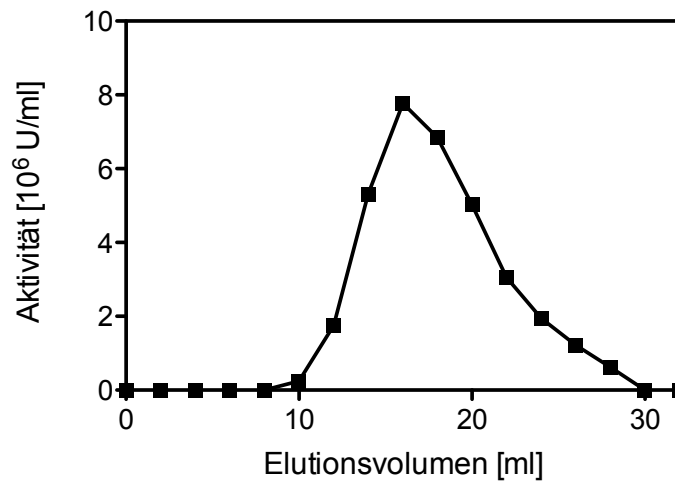


Abb. 5.2-18: Isolierung der rhTryptase γ mittels Benzamidin-Sepharose. Nach der Chromatographie wurde die enzymatische Aktivität in den Elutionsfraktionen nach einer 200-fachen Verdünnung bestimmt. Repräsentativ für alle vier Affinitätschromatographieläufe.

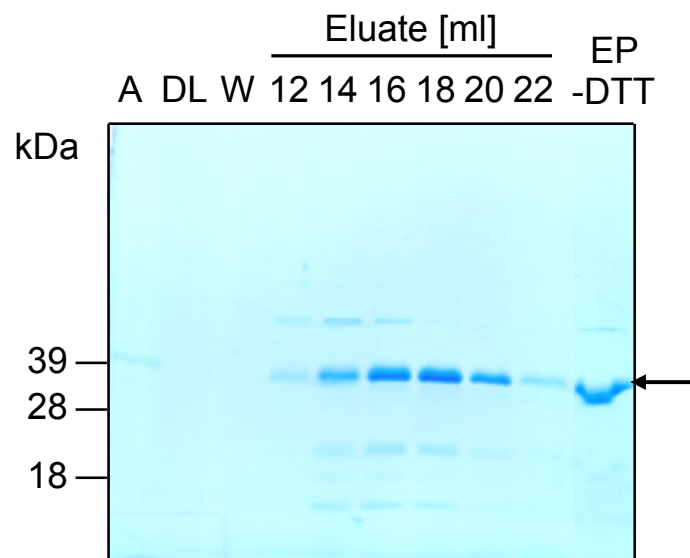


Abb. 5.2-19: Analyse der Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Nach der Chromatographie wurden Proben (10 μ l) der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE getrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. Die Hauptbande der rhTryptase γ bei etwa 35 kDa ist mit einem Pfeil markiert.

5.2.5.4 Bilanzierung der Isolierung

Zur Bilanzierung der Isolierung der rhTryptase γ sind die Ausbeuten der Chromatographie- und Dialyseschritte in Tab. 5.2-5 zusammengefasst. Die Reduktion des Volumens von 3270 ml auf 35,5 ml reflektiert die Konzentrierung der rhTryptase γ um den Faktor 100, die vor allem durch die Kationenaustauschchromatographie (20 x) erreicht wurde. Die Gesamtproteinmenge wurde von rund 8000 mg auf 57 mg um den Faktor 140 reduziert. Die Wiederfindung der rhTryptase γ beträgt bei den Chromatographieschritten über 70 %, bei den Dialyseschritten ca. 100 %. Die Gesamtausbeute der rhTryptase γ ist für ein vierstufiges Verfahren mit 63 % als sehr gut zu bewerten. Ausgehend von einer Fermentation kann durch die Isolierung rund 56 mg rhTryptase γ mit einer Konzentration von 1,5 mg/ml bzw. 42,3 μ M gewonnen werden.

Tab. 5.2-5: Bilanzierung der Isolierung der rhTryptase γ . Nach den Aufreinigungsschritten wurde jeweils die Gesamtproteinmenge mittels MicroBCA-Assay und die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ bestimmt.

Reinigungsschritt		Volumen [ml]	Aktivität [10 ⁶ U]	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute des Reinigungsschritts [%]	Gesamt- ausbeute [%]
Medium der Fermentation		3270	376	8060		
Dialyse		3300	389	7650	104	101
Kationenaustausch- chromatographie		165	282	231	73	74
Benzamidin- Sepharosen	A	18	70	16,6	25	19
	B	20	60	14,2	21	16
	C	22	39,6	12,6	14	11
	D	18	54	17,0	19	14
Dialyse + Konzentration		35,5	238	56,9	106	63

5.2.5.5 Reinheit und N-terminale Sequenzierung

Um die korrekte N-terminale Prozessierung der in *P. pastoris* exprimierten rhTryptase γ nachzuweisen, wurde die Aminosäuresequenz durch Edman-Sequenzierung bestimmt. Dazu wurde die isolierte Protease (1 μ g) auf ein Filterpapier aufgetragen und zur Visualisierung mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz mittels Gasphasensequenator (R. Mentele, MPI, Martinsried) ergab die Abfolge IVGGH. Diese Aminosäuresequenz, die dem N-Terminus der reifen Tryptase γ entspricht, zeigt die korrekte Prozessierung des Fusionskonstrukts (Abb. 5.2-1) durch die KEX2-Protease der Hefe. Der geringe Anteil an Nebensequenzen ergibt eine Reinheit der rhTryptase γ von > 95 %.

5.2.5.6 Quantifizierung der spezifischen Aktivität

Die spezifische Aktivität der isolierten rhTryptase γ wurde durch Titration mit dem reversiblen Serinprotease-Inhibitor SBTI (*Soy bean trypsin inhibitor*) bestimmt. Dafür wurde die isolierte rhTryptase γ (ca. 1 μM) mit steigenden Inhibitorkonzentrationen (0 - 2 μM) eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die residuale enzymatische Aktivität mit dem Substrat Z-Leu-Arg-AMC (Endkonz. 10 μM) über 10 min bei 37°C bestimmt (Abb. 5.2-20). Die Inhibitorkonzentration wurde zuvor mit Trypsin bestimmt, dessen Konzentration mittels Burst-Titration ermittelt worden war. Da die Equilibrium-Dissoziationskonstante des SBTI-rhTryptase γ -Komplexes mit $K_i = 0,02 \mu\text{M}$ (s. a. 4.5.9.4) unter diesen Bedingungen etwa 50 Mal geringer ist als die Enzymkonzentration, sind Titrationsbedingungen gewährleistet.

Die Anpassung der Morrison-Gleichung an die gemessene Aktivität abhängig von der Inhibitorkonzentration ergibt eine Konzentration der enzymatisch aktiven rhTryptase γ von 0,65 μM im Test bzw. unter Einberechnung des Verdünnungsfaktors eine Molarität von 41,6 μM . Bezogen auf die Proteinkonzentration von 42,3 μM entspricht dies einer spezifischen Aktivität von 96 %. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist deshalb davon auszugehen, dass die isolierte rhTryptase γ vollständig korrekt gefaltet und enzymatisch aktiv ist.

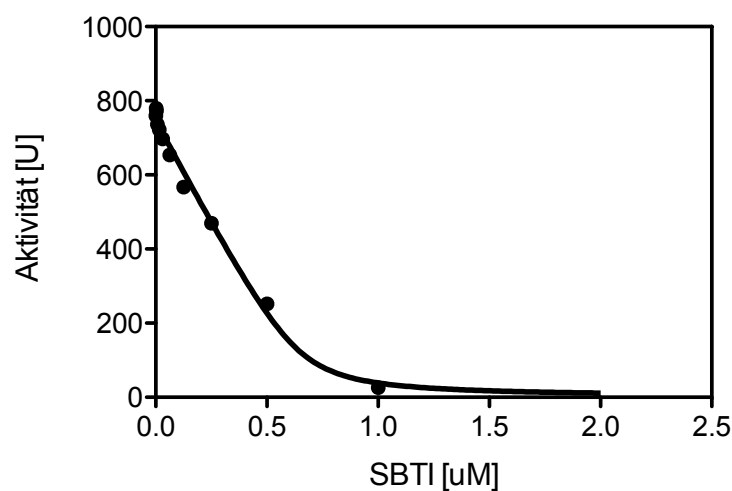


Abb. 5.2-20: Titration der rhTryptase γ mit SBTI. Die enzymatische Aktivität der isolierten rhTryptase γ wurde nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors SBTI (max. 2 μM) mit dem Substrat Z-Leu-Arg-AMC (10 μM) gemessen ($n=3$).

5.2.5.7 Analyse der Glykosylierung

Die Glykosylierung der rhTryptase γ wurde mittels Endoglycosidasen analysiert. Da sekretorische Proteine in der Hefe *P. pastoris* vor allem mit *N*-gekoppelten Mannoseresten modifiziert werden, wurde zunächst die Endoglycosidase Endo H_f verwendet, die Oligosaccharide vom Mannose-Typ von Glykoproteinen abspaltet. Für die Deglykosylierung wurde rhTryptase γ mit Endo H_f im Verhältnis 1 U/10 μ g Protein für eine Stunde bei 37°C bei einem pH von 5,5, bei dem die Endo H_f aktiv ist, inkubiert. Die anschließende Analyse mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Abb. 5.2-21) zeigt im Vergleich zur unbehandelten rhTryptase γ (35 kDa) eine zusätzliche Bande mit einer Molekülmasse von etwa 30 kDa. Dieses Ergebnis zeigt, dass rhTryptase γ eine Glykosylierung mit Oligosacchariden vom mannosereichen Typ aufweist, die rund 5 kDa des Proteins (insgesamt 35 kDa) ausmacht. Eine weitere Glykosylierung ist weitgehend auszuschließen, da die Molekülmasse des deglykosylierten Proteins (ca. 30 kDa) dem der Peptidkette (28,7 kDa) entspricht. Da bei der Deglykosylierung nur eine zusätzliche Bande beobachtet wurde, ist von nur einer Glykosylierungsstelle auszugehen, die auch bioinformatisch (NetNGlyc, Expasy) für die Aminosäure Asn48 berechnet wurde.

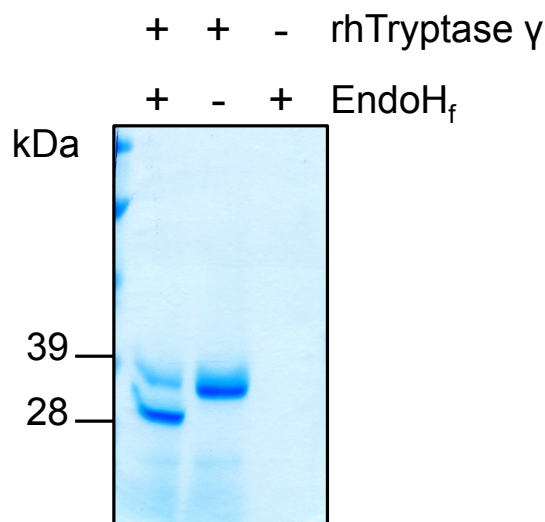


Abb. 5.2-21: Deglykosylierung der rhTryptase γ . Nach Inkubation der rhTryptase γ (3 μ g) mit Endo H_f (1 U/10 μ g Protein) wurden die Molekülmassen unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Probe mit Endo H_f zeigt eine zusätzliche Bande mit einer Molekülmasse von ca. 30 kDa.

5.3 Rekombinante Herstellung des Tryptase γ -Zymogens

Für die rekombinante Expression des Zymogens der Tryptase γ wurde ein Konstrukt verwendet (Abb. 5.3-1), das für ein Fusionsprotein aus dem α -Faktor-Signalpeptid und den Pro- und katalytischen Domänen der Tryptase γ kodiert; die hydrophobe C-terminale Domäne der Tryptase γ wurde durch einen c-myc-His₆-Tag ersetzt. Die initialen Testexpressionen mit diesem Konstrukt (Abb. 5.1-2) hatten gezeigt, dass das Zymogen proTy Δ C in großen Mengen in das Medium der Hefe sezerniert wird und Aggregate nicht auftreten. Für die präparative Expression wurde deshalb auf eine weitere biotechnologische Modifizierung verzichtet.

5.3.1 Expression im Minimal- und Vollmedium

Im Rahmen der Optimierung wurde zunächst die Expression des Zymogens in verschiedenen Kulturmedien verglichen. Dabei wurde weitgehend analog der Expressionsoptimierung der rhTryptase γ vorgegangen (s. a. 5.2.4.1). Nach Transformation des Wirtstammes X33 mit dem Expressionsplasmid pPICZ α A-proTy Δ C (s. a. 5.2.1.2) wurden in Testexpressionen (10 ml) zunächst mehrere Expressionsstämme in methanolhaltigem Vollmedium kultiviert und die Expressionsausbeute nach drei Tagen mittels Dot Blot-Analyse der Überstände untersucht. Anschließend wurde der Stamm mit der höchsten Ausbeute im kleinen Maßstab (10 ml) angezogen und im Schüttelkolben in glycerinhaltigem Voll- bzw. Minimalmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 3 kultiviert, bevor die Expression durch Zugabe von 1 % Methanol alle 24 h induziert wurde (s. a. 5.2.4.1).

Der Verlauf der Expression und die Ausbeuten wurden mittels Immunblot mit anti-His₆- und anti-Tryptase γ -Antikörpern untersucht (Abb. 5.3-1). Das rekombinante Zymogen ist nach Expression im Minimal- und im Vollmedium mit beiden Antikörpern bei einer Molekülmasse von 35 - 40 kDa detektierbar; die Doppelbande nach Detektion mit dem anti-Tryptase γ -Antikörper konnte später auf eine C-terminale Prozessierung und Abspaltung des His₆-Tags

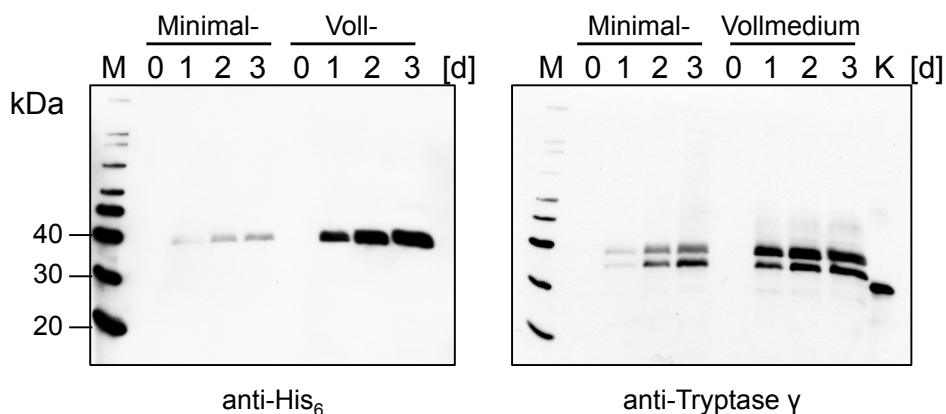


Abb. 5.3-1: Analyse der rekombinanten Expression des Zymogens in Minimal- vs. Vollmedium. An den Tagen 0 - 3 der Expression wurden Proben (1 ml) entnommen und mittels SDS-PAGE und Immunblot analysiert. Der Vergleich zeigt eine deutlich höhere Ausbeute bei Expression im Vollmedium. M Größenstandard, K Mengenkontrolle 80 ng Tryptase γ .

zurückgeführt werden (s. a. 5.5.2). Aufgrund der deutlich höheren Ausbeute und stärkeren Akkumulation über die Zeit wurde Vollmedium für die weitere rekombinante Expression im Bioreaktor verwendet.

5.3.2 Rekombinante Expression des Tryptase γ -Zymogens im Bioreaktor

Bei der präparativen Expression des Tryptase γ -Zymogens im Bioreaktor wurde weitgehend analog der Fermentation der rhTryptase γ vorgegangen (s. a. 5.2.4.2). Der Hefestamm pPICZ α A-proTy Δ C-X33 wurde zunächst im Schüttelkolben (500 ml) angezogen. Die Kultur wurde mit einem Nassgewicht von 30 g/l in den Bioreaktor überführt und dort in der Glycerin-*Batch*-Phase (Phase I) bis zu einer Dichte von ca. 100 g/l kultiviert (Abb. 5.3-2), die in der Glycerin-Fütterungsphase (Phase II) weiter auf knapp 300 g/l erhöht wurde. Anschließend wurde die Expression über drei Tage durch steigende Methanolzugabe (<0,4 - 3 %/h**I* bzw. 3 - 30 ml/h**I*) induziert, wobei der Sauerstoffgehalt in der Kultur durch Steuerung der Drehzahl und Luftzufuhr auf 32 - 35 % geregelt wurde. Der Verlauf der Fermentation wurde über die Bestimmung der Zellmasse verfolgt (Abb. 5.3-2); dabei zeigt sich ein ähnliches Wachstumsverhalten der Hefe wie bei der Fermentation des Expressionsstamms rTy Δ C-C145A/C154A-X33 mit einem steilen Anstieg der Zellmasse in Phase I und II und einem konstanten Nassgewicht in Phase III.

Da das Zymogen wie erwartet enzymatisch inaktiv ist, war es nicht möglich die Expressionsausbeute während der Fermentation mittels Aktivitätsmessung zu verfolgen (Abb. 5.3-2). Stattdessen wurde der Verlauf der Expression und die Expressionsausbeute nach Beendigung der Fermentation mittels Immunblot mit anti-His₆- und anti-Tryptase γ -Antikörpern untersucht (Abb. 5.3-3). Zur Bestimmung der Ausbeute sowie der Aggregatbildung wurde neben den Proben von Tag 0 - 3 auch eine Mengenkontrolle (K, 100 ng in *E. coli* hergestellter Tryptase γ) und eine nicht-reduzierte Probe von Tag 3 mitgeführt. Im Immunblot

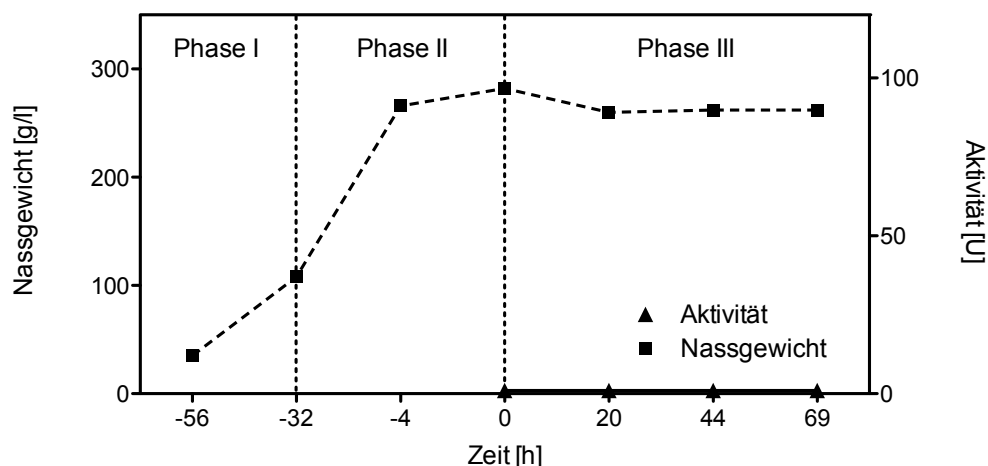


Abb. 5.3-2: Verlauf der Fermentation des Tryptase γ -Zymogens. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und das Nassgewicht der Hefekultur sowie die enzymatische Aktivität mit den Substraten Z-FR-AMC (10 μ M) bestimmt.

mit dem anti-His₆-Antikörper ist eine prominente Bande bei etwa 37 kDa zu sehen, während der anti-Tryptase γ -Antikörper wiederum eine zusätzliche Bande mit geringerer Molekülmasse detektiert (s. a. 5.3.1), die später auf eine C-terminal prozessierte Form zurückgeführt wurde (s. 5.5.2). Die Intensität der Banden steigt von Tag 0 auf Tag 1 an und bleibt danach weitgehend konstant. Eine Aggregatbildung ist nicht nachweisbar (s. nicht-reduzierte Probe, -DTT). Anhand der Mengenkontrolle (K, 100 ng) wurde die Expressionsausbeute densitometrisch auf 50 - 90 ng/10 μ l Probe bzw. 5 - 9 mg/l Kulturmedium bestimmt.

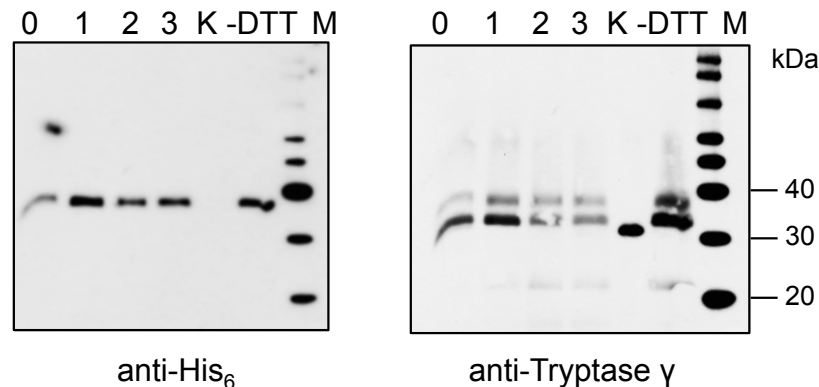


Abb. 5.3-3: Analyse der rekombinanten Expression des Tryptase γ -Zymogens im Bioreaktor. Nach der Fermentation wurden Proben (10 μ l) der Überstände von Tag 0 - 3 mittels SDS-PAGE getrennt. Das rekombinante Protein wurde im Immunblot mit anti-His₆-Antikörper und anti-Tryptase γ -Antikörpern detektiert. M Größenstandard, K Mengenkontrolle 100 ng in *E. coli* exprimierte Tryptase γ .

5.3.3 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose

Zur Isolierung des Tryptase γ -Zymogens wurde eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose verwendet. Dazu wurde der Überstand der Fermentation zuerst mittels Zentrifugation von den Zellen getrennt und das Volumen durch Tangentialfiltration über einen 10 kDa-Filter von 3 l auf 570 ml reduziert. Anschließend wurde das Retentat 3:1 (v/v) mit dem Bindungspuffer verdünnt und nach Einstellung des pH-Werts auf 8 auf eine Ni-NTA-Agarose-Säule (10 ml, 5,7 x 0,75 cm, h x r) aufgetragen (1 ml/min). Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit dem Bindungspuffer gewaschen, bis eine $A_{280} < 0,1$ erreicht wurde. Das Tryptase γ -Zymogen wurde dann mit steigenden Imidazolkonzentrationen im Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Elutionsfraktionen mit den höchsten Absorptionswerten wurden vereinigt, über einen 10 kDa Filter um den Faktor 2 aufkonzentriert, zur Entfernung des Imidazols gegen den Lagerungspuffer (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 6,0) dialysiert und bei -20°C gelagert.

Der Verlauf der Elution wurde über die Absorption bei 280 nm (Abb. 5.3-4) verfolgt, die ein deutliches Maximum nach dem Wechsel auf 50 mM Imidazol bei 8 - 24 ml Elutionsvolumen zeigt. Die Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 100 mM im Elutionspuffer führt zu einem weiteren, jedoch kleinem Anstieg der Absorption A_{280} .

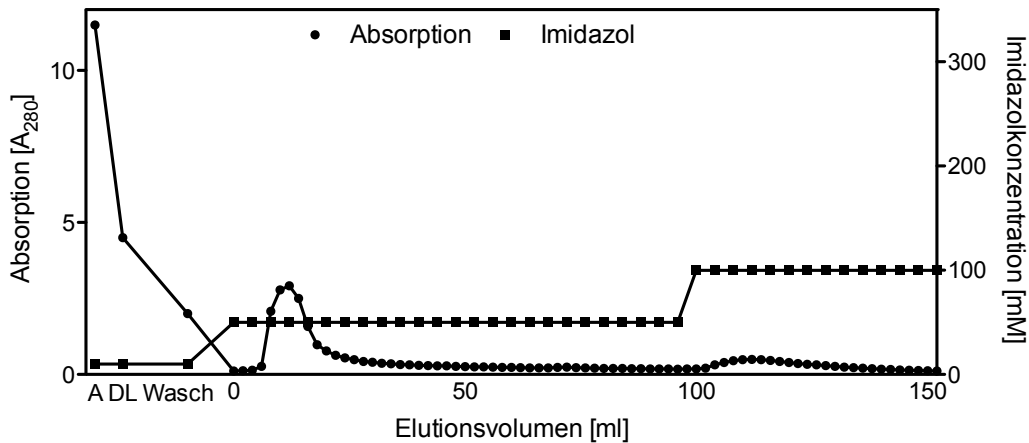


Abb. 5.3-4: Isolierung des Tryptase γ -Zymogens mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose. Während der Aufreinigung wurden Fraktionen gesammelt (2 ml) und die Absorption bei 280 nm bestimmt. Nach Wechsel der Imidazolkonzentration auf 50 mM eluiert das Zymogen zwischen 8 und 24 ml.

Die Analyse der Isolierung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Abb. 5.3-5A) zeigt in den Elutionsfraktionen eine Hauptbande bei 37 kDa, die in Auftrag, Durchlauf und Waschfraktion (A, DL, W) kaum wahrzunehmen ist. Die breite Bande zwischen 47 - 100 kDa konnte mittels Immunblot mit dem anti-Tryptase γ -Antikörper als (hyper)glykosylierte Form des Zymogens identifiziert werden (Abb. 5.3-5C). Die Banden mit geringerer Molekülmasse, bei denen es sich vermutlich um Degradierungsprodukte des Zymogens handelt, wurden durch weitere Aufreinigung mittels Dialyse und Ultrafiltration (Abb. 5.3-5B) weitgehend entfernt.

Die Bilanzierung der Isolierung ist dadurch erschwert, dass die Konzentration des Tryptase γ -Zymogens auf der semiquantitativen Bestimmung mittels His₆-Immunblot beruht (Tab. 5.3-1). Insgesamt wurden 8,8 mg Zymogen ausgehend von ca. 15 mg in 4600 mg Gesamtprotein im Kulturmedium isoliert. Dies entspricht einer etwa 500-fachen Reinigung und einer 375-fachen Aufkonzentrierung bei einer Ausbeute von etwa 60 %.

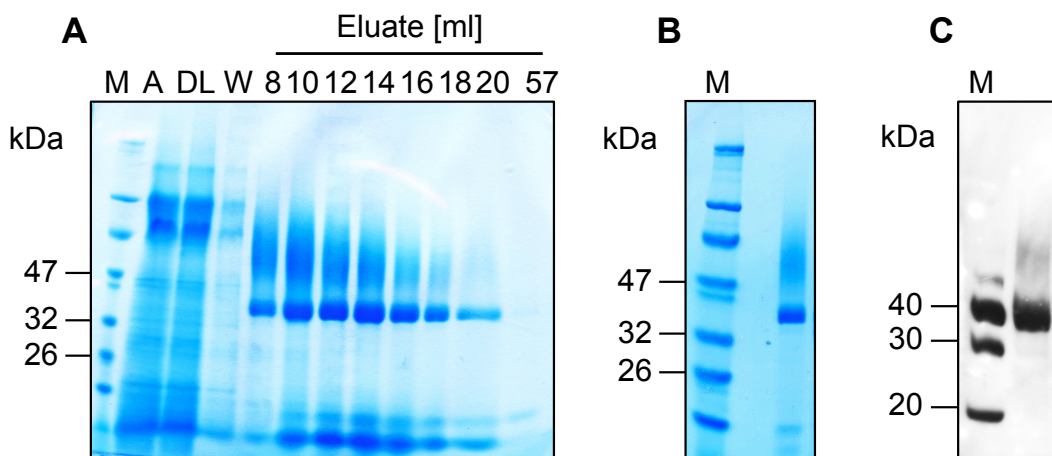


Abb. 5.3-5: Isolierung des Tryptase γ -Zymogens mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. A) Von den Fraktionen der Aufreinigung wurden Proben (10 μ l) mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie gefärbt. Die Hauptbande liegt zwischen 32 und 47 kDa. A Auftrag, DL Durchlauf, W Waschfraktion, E Elution. B) Eine Probe des Elutionspools wurde nach Dialyse und Konzentrierung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Der letzte Aufreinigungsschritt führt zur Reduktion der Degradierungsprodukte. C) Die Banden mit einer molekularen Masse > 40 kDa wurden im Immunblot mit dem anti-Tryptase γ -Antikörper als glykosylierte Form des Zymogens detektiert.

Tab. 5.3-1: Bilanzierung der Isolierung des Tryptase γ -Zymogens. Die Proteinmengen wurden mittels Micro BCA-Assay bestimmt und die des Zymogens mittels Immunblot abgeschätzt.

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]	Zymogen mit His ₆ Tag [mg]
Medium	3000	1,5	4600	15
Auftrag	570	8	4560	
Durchlauf	570	7,25	4130	
Waschfraktion	100	4	400	
Ni-Eluat	16	0,89	14,2	
Dialyse + Konzentrierung	8	1,1	8,8	8,8

5.3.4 Prozessierung des Tryptase γ -Zymogens mit Trypsin

Um die Frage zu klären, ob das rekombinante Zymogen zu einer reifen, enzymatisch aktiven Protease prozessiert werden kann, wurde das Tryptase γ -Zymogen mit Trypsin inkubiert und die Prozessierung mittels SDS-PAGE und Aktivitätsmessung verfolgt. Dazu wurde das Zymogen (10 μ M) mit Trypsin (0,01 μ M) über 24 h bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (10 μ l) entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert (Abb. 5.3-6). Schon kurze Zeit nach Zugabe des Trypsins (0 h) ist eine zusätzliche Bande mit einer Molekularmasse von ca. 35 kDa neben der Bande des Zymogens von ca. 37 kDa sichtbar; die weitere Inkubation führt zum Verlust der Zymogen-Bande, eine weitere Degradierung ist nicht zu beobachten.

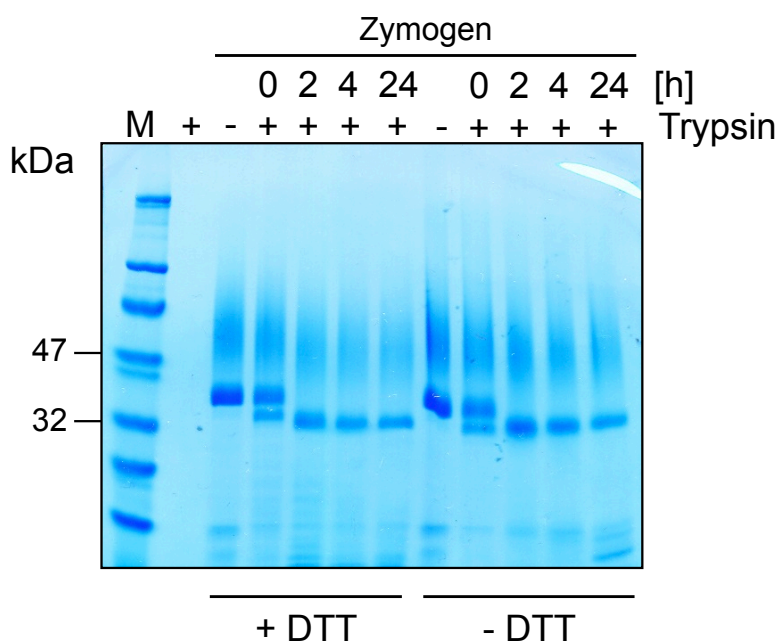


Abb. 5.3-6: Analyse der Prozessierung des Tryptase γ -Zymogens durch Trypsin. Nach Inkubation des Zymogens (10 μ M) mit Trypsin (0,01 μ M) wurden Proben (10 μ l) entnommen und unter reduzierenden (+DTT) und nicht-reduzierenden (-DTT) Bedingungen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Zur Analyse der Zymogenprozessierung mittels Aktivitätsmessung wurde das Zymogen (125 nM) mit Trypsin (0,25 nM) über 48 h bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die enzymatische Aktivität mit dem Substrat Z-FR-AMC (10 µM) bestimmt (Abb. 5.3-7). Schon nach zwei Stunden ist eine 3-fache Zunahme der Aktivität (570 ± 50 U) zu sehen, die nach 24 h ihr Maximum (1700 ± 300 U) erreicht und nach 48 h abnimmt. Die enzymatische Aktivität des zur Kontrolle mitgeführten Trypsins (160 ± 30 U) und der rhTryptase γ (1680 ± 150 U) sind über die Zeit konstant.

Nach 24-stündiger Inkubation des Zymogens mit Trypsin entspricht die Aktivitätszunahme weitgehend der Aktivität der rhTryptase γ in gleicher Konzentration, sodass von einer vollständigen Prozessierung und Aktivierung ausgegangen werden kann. Die Prozessierung des Zymogens zur reifen Form bestätigen die korrekte Faltung des rekombinanten Proteins, das vor weiteren proteolytischen Abbau geschützt ist. Da eine Zweikettenform nicht sicher nachzuweisen ist, ist anzunehmen, dass das Propeptid wahrscheinlich durch Trypsin weiter abgebaut wird; dies könnte durch die Reste R-18 und R-10 (bzw. R20 und R28) bedingt sein. Durch diese Prozessierung wird das Propeptid von 18 auf 8 Aminosäuren verkürzt und ist somit mit einem Molekulargewicht von 0,67 kDa (Protparam, Expasy) im SDS-Gel nicht mehr nachweisbar.

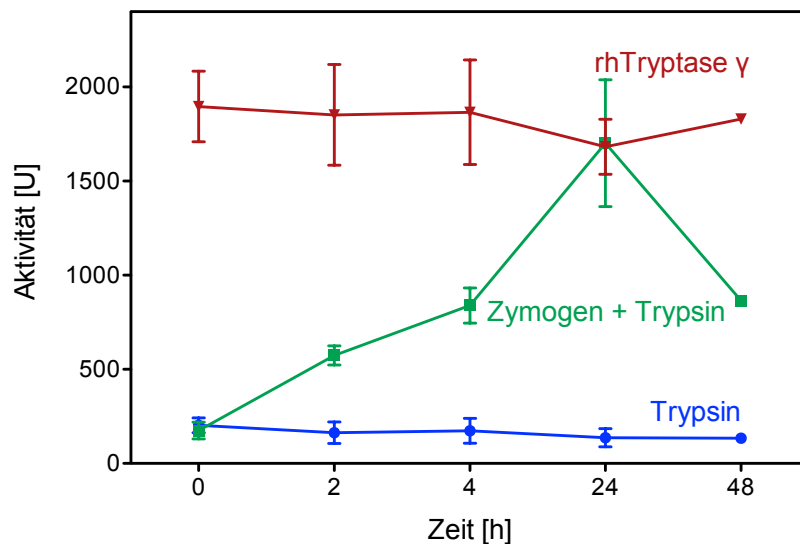


Abb. 5.3-7: Prozessierung des Tryptase γ -Zymogens mit Trypsin. Das Zymogen (125 nM) wurde mit Trypsin (0,25 nM) über die Zeit bei 37°C inkubiert und die enzymatische Aktivität zu den gegebenen Zeitpunkten mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC (10 µM) gemessen. Trypsin und rhTryptase γ wurden analog über die Zeit bei 37°C inkubiert und die enzymatische Aktivität mit dem Substrat Z-FR-AMC gemessen. Trypsin (0,25 nM) und rhTryptase γ (125 nM) zeigen über die Zeit eine weitgehend konstante Aktivität. Die Inkubation des Zymogens mit Trypsin führt zur (kompletten) Aktivierung innerhalb von 24 h. Mittelwerte \pm SD, n=4.

5.3.4.1 Konformationsbestimmung mittels CD-Spektroskopie

Zur Analyse der Sekundärstrukturen und Faltung der rhTryptase γ und des Zymogens im Vergleich zur Tryptase β wurde eine Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie durchgeführt. Die CD-Spektren der Proteine (6 μ M) wurden im fernen UV-Licht von 200 - 240 nm bei konstanter Temperatur von 37°C an einem Jasco-715 CD Spectrapolarimeter gemessen (MPI für Biochemie, Martinsried) (Abb. 5.3-8). Für den Vergleich der Spektren verschiedener Proteine wurde die gemessene molare Elliptizität ($[\theta]$) durch die Anzahl der Aminosäurereste dividiert und in die mittlere Restelliptizität konvertiert (MRE). Das CD-Spektrum der rhTryptase γ zeigt einen ähnlichen Verlauf wie das der Tryptase β mit einem charakteristischen dichroischen Minimum bei 230 nm. Die Denaturierung der rhTryptase γ (10 min, 95°C) führt zu einem CD-Spektrum, das gegen Null tendiert und damit deutlich weniger Elliptizität aufweist, das den zu erwartenden Verlust der Sekundärstrukturen verifiziert. Das Zymogen der Tryptase γ zeigt ein CD-Spektrum mit geringer Elliptizität, das dem denaturierter rhTryptase γ ähnelt.

Der Anteil der α -helikalen und β -Faltblatt-Strukturen (Tab. 5.3-2) der Proteine wurde durch die Analyse des molaren zirkulären Dichroismus ($\Delta\epsilon$) mittels K2D2- und K2D3-Software berechnet [97, 98]. Dazu wurden die Werte des MRE durch den Umrechnungsfaktor 3298 dividiert. Die rhTryptase γ hat mit etwa 7,5 % α -Helix und 31 % β -Faltblatt einen ähnlichen Anteil dieser Sekundärstrukturen wie die Tryptase β (6,5 % bzw. 32 %). Die mittels Spektroskopie ermittelten Werte der Tryptase β entsprechen weitgehend denen aus der Kristallstruktur (1A0L) berechneten Werte (7 % und 29 %). Wie erwartet führt die

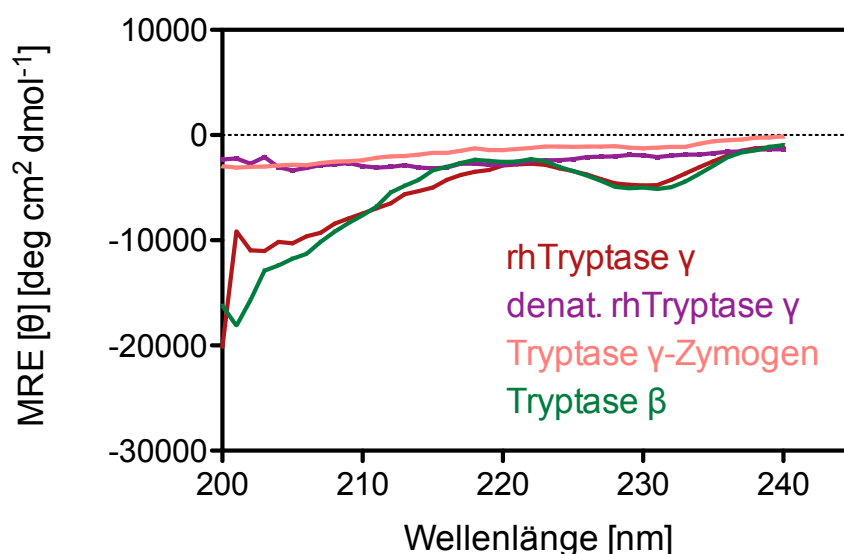


Abb. 5.3-8: Analyse der Sekundärstruktur der rhTryptase γ mittels CD-Spektroskopie. Die CD-Spektren der Proteine (6 μ M) wurden an einem Jasco-715 CD Spectrapolarimeter gemessen. Die rhTryptase γ wurde durch Erhitzen (95°C, 10 min) denaturiert.

Denaturierung der rhTryptase γ zum Verlust α -helikaler Strukturen und zur Zunahme von β -Faltblatt auf 1,7 % bzw. 45 %. Das Zymogen weist mit 2 % und 46 % einen ähnlichen Anteil der Sekundärstrukturen wie das denaturierte Protein auf.

Der Vergleich mit verwandten Serinproteasen wie Trypsin und α -Chymotrypsin zeigt einen ähnlichen Anteil der α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen mit ≤ 10 % bzw. ≥ 30 %. Die Zymogene weisen dagegen einen höheren Anteil von α -Helices und einen geringeren Anteil an β -Faltblattstrukturen auf. Damit bestätigen die CD-Spektren der rhTryptase γ und Tryptase β einen Trypsin-ähnlichen Aufbau bzw. Anteil der Sekundärstrukturen, während das Tryptase γ -Zymogen wie auch andere Zymogene anscheinend weitgehend ungefaltet vorliegt. Jedoch zeigt die Prozessierung des Tryptase γ -Zymogens mit Trypsin, dass die Konvertierung zu einer enzymatisch aktiven, reifen Form möglich ist (s. 5.3.4).

Tab. 5.3-2: Analyse der CD-Spektren mittels K2D2- und K2D3-Software. Der Anteil der α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen in den Proteinen wurde mittels K2D2- und K2D3-Algorithmen basierend auf dem molaren zirkulären Dichroismus ($\Delta\epsilon$) ermittelt. Zum Vergleich sind die aus den Kristallstrukturen ermittelten Sekundärstrukturen aus der Protein Data Bank www.rcsb.org angegeben.

	K2D2		K2D3		PDB (Author Sec. Struc.)		
	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	PDB ID	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]
rhTryptase γ	6,9	32,0	8,3	30,4			
denat. rhTryptase γ	1,8	47,4	1,6	42,3			
Tryptase γ -Zymogen	3,1	49,3	1,0	43,3			
Tryptase β	6,9	32,0	6,2	32,8	1A0L	7	29
Trypsin					1TRN	3	32
Trypsinogen					1TGN	6	21
α -Chymotrypsin B					5CHA	10	40
α -Chymotrypsinogen					2CGA	17	14

5.4 Rekombinante Expression einer enzymatisch inaktiven Tryptase γ -Variante

5.4.1 Herstellung des Expressionsplasmids

Serinproteasen sind durch die katalytische Triade His57-Ser195-Asp102 (Chymotrypsin-Nummerierung) des aktiven Zentrums definiert, die ein tetraedrisches Intermediat zwischen dem Serin und einer Carboxylgruppe des Substrats aufbaut. Um eine enzymatisch inaktive Variante der Tryptase γ für funktionelle Analysen herzustellen, wurde das Serin 222 der Tryptase γ , das dem Ser195 in Chymotrypsin-Nomenklatur entspricht, mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ersetzt. Analog der Herstellung der Cystein-Varianten (s. a. 4.2.1.1) wurden zunächst Primer entworfen, die an zentraler Stelle die kodierende Sequenz des Alanins (GCC) anstatt der des Serins (TCC) enthalten. Diese Primer wurden in einer PCR mit dem Plasmid pPICZ α A-rTy Δ C-C145A/C154A als Template eingesetzt. Die methylierten Template-Plasmide wurden anschließend durch das Restriktionsenzym DpnI abgebaut und die mutierten Amplikons zur Transformation von superkompetenten *E. coli*-Zellen verwendet. Nach Kultivierung der transformierten *E. coli*-Zellen auf zeocinhaltigen Agarplatten wurden einzelne Kolonien in LB-Zeocin-Medium angezogen, die Plasmide isoliert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung (Abb. 5.4-1) zeigt den erfolgreichen Austausch T666G und damit den Aminosäureaustausch S222A bzw. S195A.

	620	560	640	650	660	670	680	690	700
pPICZ α A-rTy Δ C	CCGACATGCTGTGTGCCCGGGGCCCCGGGGATGCCTGCCAGGACGAC	CCGGGGGGCCTCTGGTCTGCCAGGTGAACGGTGCCCTG							
Translation	D M L C A R G P G D A C Q D D	S G G P L V C Q V N G A W							
pPICZ α A-rTy Δ C-S195A	CCGACATGCTGTGTGCCCGGGGCCCCGGGGATGCCTGCCAGGACGAC	CCGGGGGGCCTCTGGTCTGCCAGGTGAACGGTGCCCTG							
Translation	D M L C A R G P G D A C Q D D	A G G P L V C Q V N G A W							

Abb. 5.4-1: Sequenzierung der Expressionsplasmide. Die Plasmide wurden sequenziert und Ausschnitte aus der Nukleotidsequenz mit entsprechender Translation sind hier dargestellt. Die Punktmutation des T zu G und der Austausch S222A bzw. S195A (Chymotrypsin Nomenklatur) nach Translation sind hervorgehoben.

5.4.2 Rekombinante Expression der S195A-rhTryptase γ

Die S195A-Variante der rhTryptase γ wurde analog der rhTryptase γ in *P. pastoris* exprimiert. Dazu wurde der *P. pastoris*-X33 Stamm mit dem Konstrukt pPICZ α A-rTy Δ C-S195A transformiert und acht so generierte Expressionsstämme hinsichtlich der Expressionsausbeute mittels Dot-Blot-Analyse untersucht (s. a. 5.2.1.2). Anschließend wurden vier dieser Stämme und als Kontrolle der Stamm rTy Δ C-C145A/C154A-X33 im Schüttelkolben kultiviert und die Expression über drei Tage durch tägliche Methanolzugabe (1 %) induziert. Die Expressionsausbeuten wurden mittels Immunblot mit anti-His₆- und anti-Tryptase γ -Antikörpern (Abb. 5.4-2) sowie der Bestimmung der enzymatischen Aktivität (Abb. 5.4-3) analysiert. Die Immunblots zeigen im Vergleich zur rhTryptase γ ein nahezu identisches Laufverhalten der rTy Δ C-S195A mit einer bzw. zwei Banden zwischen 30 und 40 kDa (s. a. Abb. 5.3-1, Abb. 5.3-3). Dagegen konnte – wie erwartet – im Fermentations-

überstand der S195A-Stämme im Gegensatz zu dem der rhTryptase γ keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Die Expressionsausbeuten wurden deshalb mittels Immunblot geschätzt, im Vergleich zur rhTryptase γ (0,1 mg/l) betrugen sie 0,1 - 0,5 mg/l. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die rTy Δ C-S195A in *P. pastoris* mit ähnlichen Ausbeuten wie die rhTryptase γ exprimiert wird und dass sie wie das Zymogen enzymatisch inaktiv ist. Auf eine präparative Expression im Bioreaktor wurde bisher verzichtet.

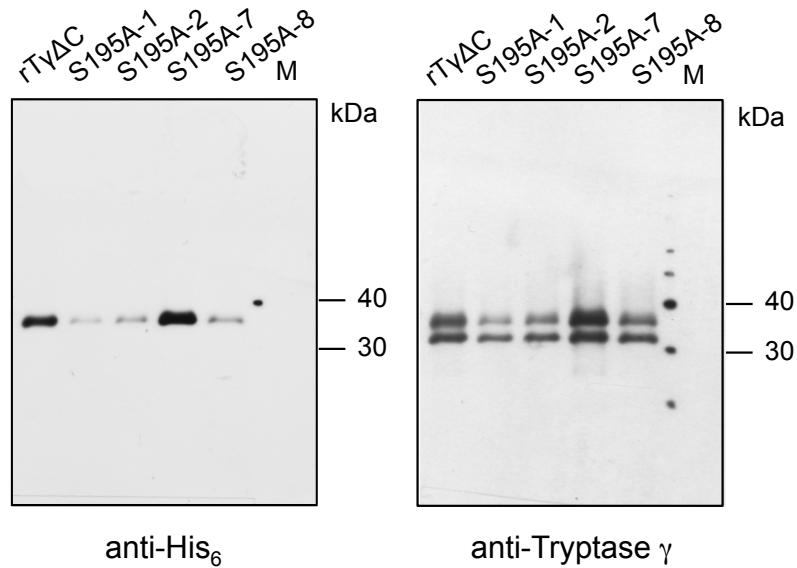


Abb. 5.4-2: Immunblot der S195A-Variante der rhTryptase γ . Nach der rekombinanten Expression im Schüttelkolben wurden Proben unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE getrennt. Die Proteine wurden im Immunblot mit anti-His₆- und anti-Tryptase γ -Antikörpern detektiert. Die Banden der rTy Δ C-S195A zeigen das gleiche Laufverhalten zwischen 30 und 40 kDa wie die rhTryptase γ .

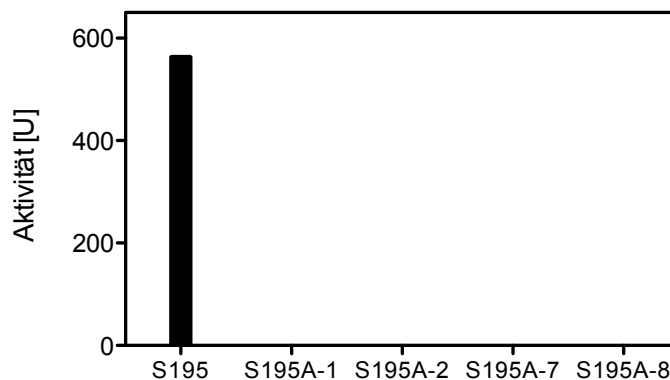


Abb. 5.4-3: Messung der enzymatischen Aktivität der S195A-Variante der rhTryptase γ . Nach der rekombinanten Expression über drei Tage wurde die enzymatische Aktivität in Proben (50 μ l) der Hefeüberstände mit dem Substrat Z-FR-AMC (10 μ M) gemessen. Unter diesen Bedingungen ist im Gegensatz zur rhTryptase γ in den Überständen der S195A-Variante keine enzymatische Aktivität nachweisbar.

5.5 Funktionelle Charakterisierung der Tryptase γ

5.5.1 Prozessierung des Zymogens

Die Prozessierung des Zymogens zur reifen Form ist ein wesentlicher Schritt in der Regulation von Proteasen. Die Inkubation des Tryptase γ -Zymogens mit Trypsin zeigt (s. 5.3.4), dass das rekombinante Zymogen prinzipiell aktivierbar ist. Da Trypsin als Protease des Verdauungssystems nicht als physiologisch relevanter Aktivator in Betracht kommt, wurde die Prozessierung des Zymogens auch durch physiologisch relevante Proteasen analysiert. In Mastzellen wird Tryptase γ mit Tryptase β co-exprimiert, beide Proteasen sind in Granula lokalisiert. Tryptase β ist bei physiologischem pH 7,4 in Anwesenheit von Heparin als Tetramer enzymatisch aktiv, jedoch bei pH 6,0, der in den Mastzell-Granula vorliegt, mit kurzkettigem Heparin (≈ 10 Disaccharide/Molekül) auch als Monomer aktiv und durch Aprotinin hemmbar [43]. Um die Aktivierung des Zymogens durch Tryptase β zu untersuchen, wurde das Tryptase γ -Zymogen ($3 \mu\text{M}$) mit Tryptase β -Monomeren (3 nM) bei pH 6,0 mit kurzkettigen Heparin sowie mit Tryptase β -Tetrameren (30 nM) bei pH 7,4 mit langkettigen Heparin über 6 h inkubiert. Als Kontrollen wurde das Zymogen mit Trypsin (6 nM) inkubiert und alle Ansätze mit Aprotinin ($10 \mu\text{M}$) versetzt; die rhTryptase γ ($3 \mu\text{M}$) wurde als Referenz ebenfalls über die Zeit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 1:60 verdünnt und die enzymatische Aktivität bei physiologischen pH 7,4 mit dem Substrat Z-FR-AMC bestimmt (Abb. 5.5-1). Das Tryptase γ -Zymogen zeigt in Anwesenheit von Tryptase β -Monomer einen Anstieg der enzymatischen Aktivität innerhalb von zwei Stunden. Die Aktivität des prozessierten Zymogens mit Tryptase β -Monomer (mTryptase β) ist wie mit

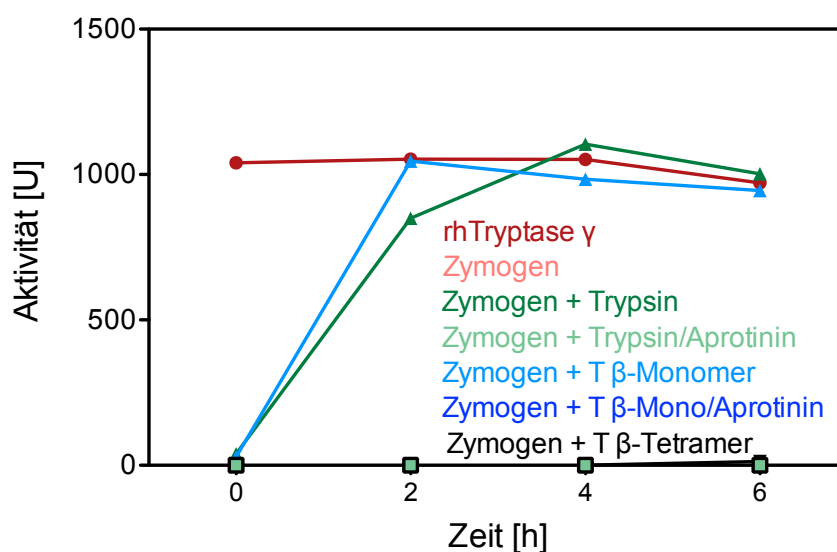


Abb. 5.5-1: Prozessierung des Zymogens mit monomerer Tryptase β . Das Zymogen ($3 \mu\text{M}$) wurde mit dem Tryptase β -Monomer (3 nM), Tryptase β -Tetramer (30 nM) bzw. Trypsin (6 nM) sowie in Abhängigkeit von Aprotinin ($10 \mu\text{M}$) über 6 h bei 37°C inkubiert. Nach einer 1:60 Verdünnung wurde die enzymatische Aktivität mit dem Substrat Z-FR-AMC ($10 \mu\text{M}$) gemessen.

Trypsin über 6 h stabil und erreicht ähnliche Werte wie die reife Form der Tryptase γ . Die Inkubation des Zymogens mit dem Tryptase β -Tetramer führt dagegen zu keiner Zunahme in der enzymatischen Aktivität. Auch nach Inhibition der Aktivatoren mit Aprotinin wird keine Prozessierung des Zymogens beobachtet.

Zur Analyse der Prozessierung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) und Coomassie-Färbung untersucht (Abb. 5.5-2). Dabei wird deutlich, dass die Bande der rhTryptase γ mit einer Molekülmasse von 33 kDa und die Bande des Zymogens allein mit einer Masse von 37 kDa über die Zeit stabil sind. Durch die Inkubation des Zymogens mit dem Tryptase β -Monomer wird dagegen schon nach kurzer Zeit (0 h) eine zusätzliche Bande mit einer Molekularmasse von ca. 35 kDa sichtbar, deren Intensität nach zwei Stunden stark zunimmt, während ab 4 h gleichzeitig der Verlust der Bande des Zymogens zu beobachten ist. Die Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigt einen ähnlichen Bandenverlauf wie unter reduzierenden Bedingungen und weist demnach nicht auf eine Zweikettenform hin.

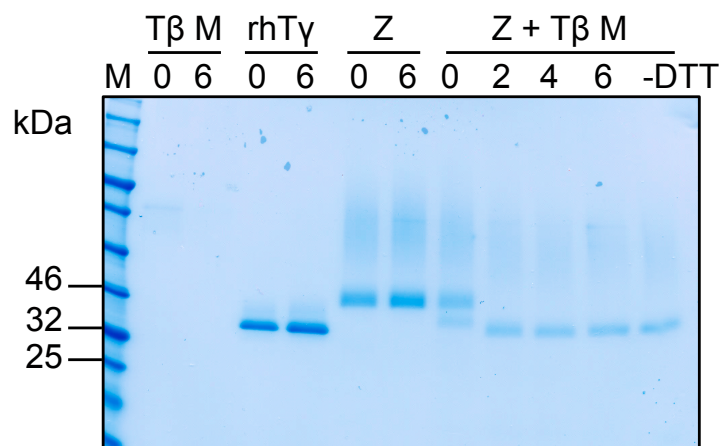


Abb. 5.5-2: Analyse der Zymogenprozessierung durch Tryptase β -Monomer mittels SDS-PAGE. Nach Inkubation des Zymogens (Z; 3 μ M) mit Tryptase β -Monomer (T β M; 3 nM) über 6 h bei 37°C wurden Proben entnommen und unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Probe „6 h“ wurde außerdem unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-DTT) analysiert. Tryptase β -Monomer prozessiert das Zymogen zur reifen Form; eine Zweikettenform ist nicht zu beobachten. rhTy – rhTryptase γ .

Um weitere potenzielle Aktivatoren zu identifizieren, wurde das Zymogen (500 nM) mit Proteasen der Mastzell-Granula, des Lysosoms und des Serums (je 10 nM) über 24 h bei 37°C inkubiert und die enzymatische Aktivität bei physiologischem pH 7,4 mit dem Substrat Z-FR-AMC (10 μ M) verfolgt (Abb. 5.5-3). Unter diesen Bedingungen wurde jedoch keine Zunahme der enzymatischen Aktivität bzw. Aktivierung des Tryptase γ -Zymogens beobachtet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass monomere Tryptase β das Tryptase γ -Zymogen aktivieren kann und damit ein potenzieller physiologischer Aktivator in den Mastzell-Granula ist.

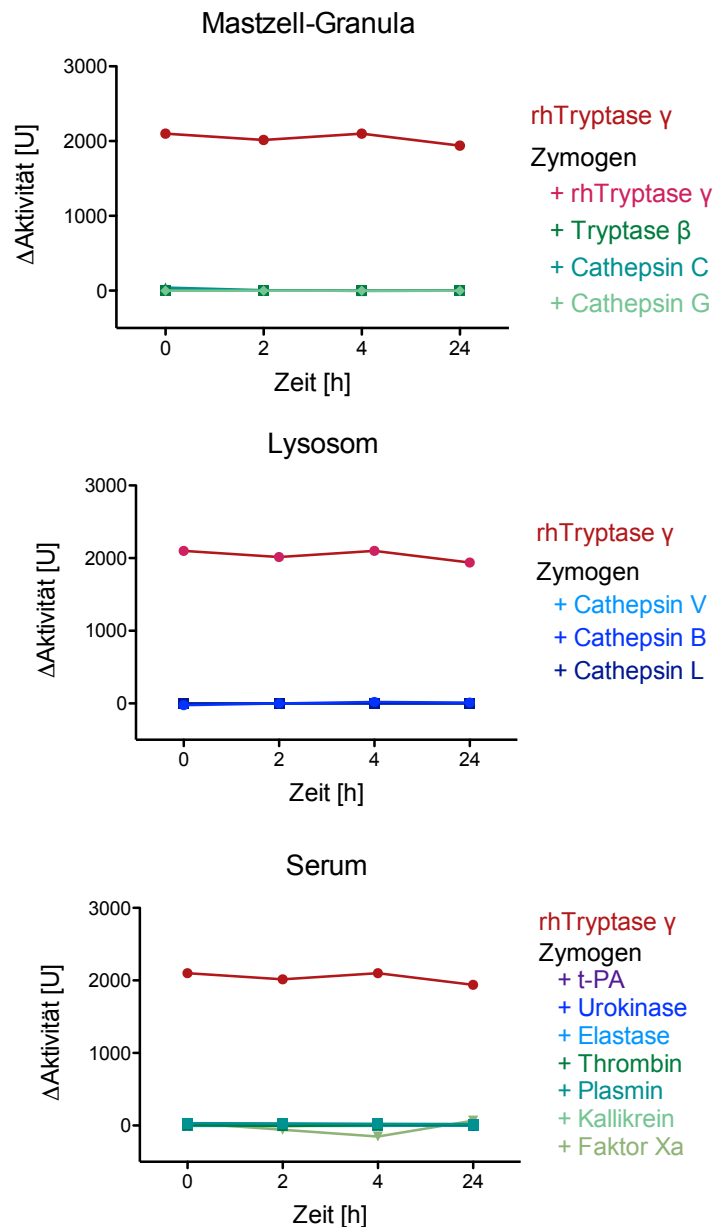


Abb. 5.5-3: Analyse der Prozessierung des Tryptase γ -Zymogens. Das Zymogen (500 nM) wurde mit verschiedenen Proteasen (je 10 nM) bis zu 24 h inkubiert. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden die Proben 1:4 verdünnt, die enzymatische Aktivität mit dem Substrat Z-FR-AMC (10 μ M) gemessen und die Differenz zur Aktivität des Aktivators allein in Abhängigkeit vom Zymogen bestimmt.

5.5.2 Prozessierung der C-terminalen Domäne

Die im Rahmen der Expression der rhTryptase γ , des Zymogens und der S195A-Variante der Tryptase γ hergestellten Immunblots zeigen je nach Detektionsverfahren mittels anti-His₆-Antikörper oder anti-Tryptase γ -Antikörper ein unterschiedliches Muster: Während mit dem anti-His₆-Antikörper nur eine Bande mit einer Molekülmasse von 35 bzw. 37 kDa detektiert wird, weist der anti-Tryptase γ -Antikörper eine zusätzliche Bande mit einer Molekülmasse von etwa 33 kDa nach (s. Abb. 5.3-3). Die geringere Masse und der Verlust der His₆-Immunreaktivität lassen eine C-terminale Prozessierung während der rekombinanten

Expression vermuten. Um die Spaltungsstelle zu identifizieren, wurde das C-terminale Degradierungsprodukt nach der rekombinanten Expression der rhTryptase γ mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert (s. a. 5.2.5.1). Elutionsfraktionen mit hoher Absorption bei 280 nm, aber ohne nachweisbarer enzymatischer Aktivität wurden zusammen mit Auftrags-, Durchlauf- und Waschfraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 5.5-4A). In den Elutionsfraktionen ist vor allem eine Bande mit niedriger Molekularmasse (< 18 kDa) zu sehen. Die Bande wurde aus dem Gel isoliert und die N-terminale Sequenz mittels Edman-Methode bestimmt (R. Mentele, MPI für Biochemie, Martinsried). Die ermittelte Sequenz HITA... zeigt, dass die Spaltung nach dem Aminosäurerest R267 (WIRR-HITA) nahe des C-Terminus der rhTryptase γ zu einem Fragment mit einer Größe von 37 Aminosäuren bzw. 4 kDa führt (Abb. 5.5-4B). Diese Schnittstelle liegt zwischen der katalytischen Domäne und der hydrophoben Sequenz, die im rekombinanten Protein durch den c-myc/His₆-Tag ersetzt wurde. Die Spaltung des wt-Proteins an dieser Position führt damit zur Freisetzung der katalytischen Domäne von der Transmembrandomäne, d. h. zu einem *Shedding*-Ereignis. Da die Proform und die inaktive Variante der Tryptase γ analog prozessiert wurden, ist nicht von einer Autoprozessierung auszugehen, sondern von einer Furin-ähnlichen Protease der Hefe *P. pastoris*, die an dibasischen Sequenzen wie WIRR-HITA schneidet. Insgesamt zeigen diese Daten, dass durch die dibasische Sequenz zwischen der katalytischen und hydrophoben Domäne ein *Shedding*-Ereignis der enzymatisch aktiven Tryptase γ durch Furin-ähnliche Protease möglich ist.

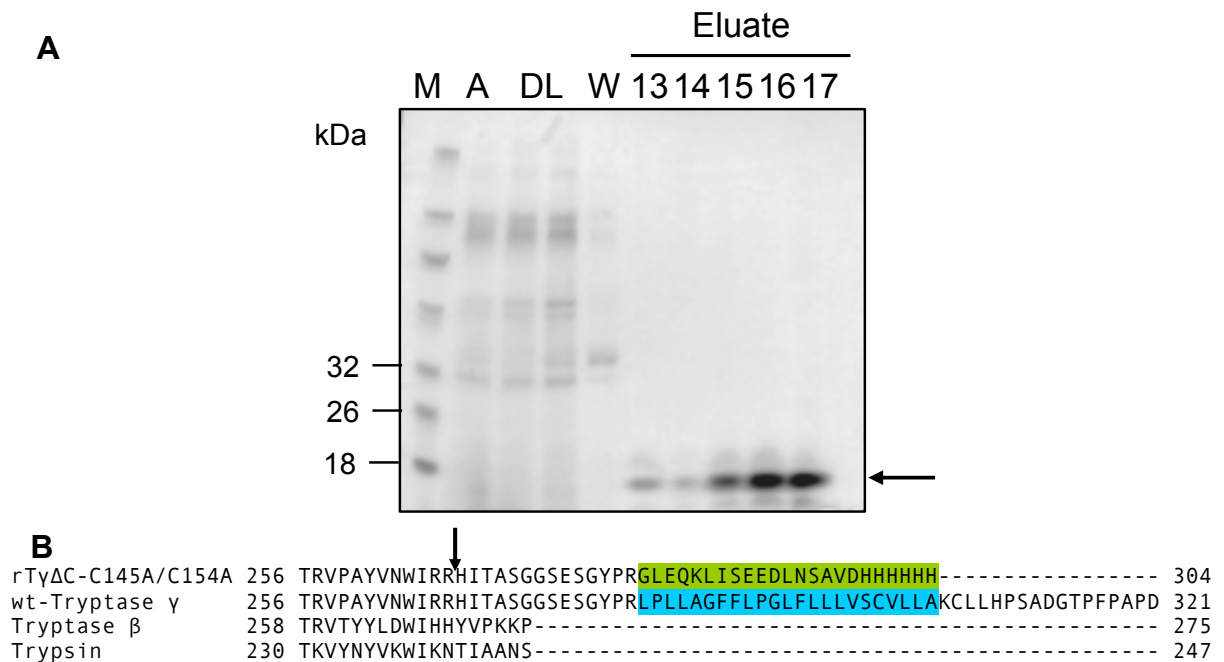


Abb. 5.5-4: C-terminale Prozessierung der rhTryptase γ . **A)** Nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden Proben (10 μ l) einzelner Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden die Banden mit einer molekularen Masse < 18 kDa auf Filterpapier übertragen und mittels Edman-Methode N-terminal sequenziert. **B)** Aminosäuren-Sequenzvergleich der C-terminalen Domänen der rhTryptase γ (rTyΔC-C145A/C154A), wt-Tryptase γ , Tryptase β und Trypsin. Die potenzielle Spaltstelle zwischen R267 und H268 ist

mit einem Pfeil markiert. Der c-myc-His₆-Tag ist hellgrün und die hydrophobe Domäne der wt-Tryptase γ ist hellblau hinterlegt.

5.5.3 Analyse der Quartärstruktur mittels Gelfiltration

Ein charakteristisches Merkmal der Tryptasen α und β ist die Ausbildung nicht kovalent gebundener Tetramere, die aus vier identischen Monomeren bestehen. Zur Analyse der quaternären Struktur der rhTryptase γ im Vergleich zu Tryptase β wurde die molekulare Masse in Lösung mittels Gelfiltration bestimmt. Dazu wurden die Proteasen (je 100 μ g) auf eine Superose 12 10/300 GL Gelfiltrationssäule am ÄKTAexplorer mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen; die Säule war zuvor mit verschiedenen Proteinen bekannter Größe (14 - 440 kDa) kalibriert worden. Als mobile Phase wurde ein Puffer mit hoher Salzkonzentration (1 M NaCl, pH 6) verwendet, der das Tryptase β -Tetramer stabilisiert [107]. Die Bestimmung der Absorption A_{280} (Abb. 5.5-5) zeigt die Elution der Tryptase β bei einer molekularen Masse von etwa 130 kDa, die der von vier Monomeren (je ca. 32 kDa) entspricht. Dagegen wird die rhTryptase γ bei einer Masse von ca. 40 kDa eluiert, d.h. der Masse der glykosylierten katalytischen Domäne (\sim 33 kDa). Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Tryptasen in den Elutionsfraktionen (Abb. 5.5-5) zeigt, dass Aktivität und Proteine parallel von der Säule eluieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass rhTryptase γ als Monomer vorliegt und enzymatisch aktiv ist, Tryptase β dagegen als Tetramer.

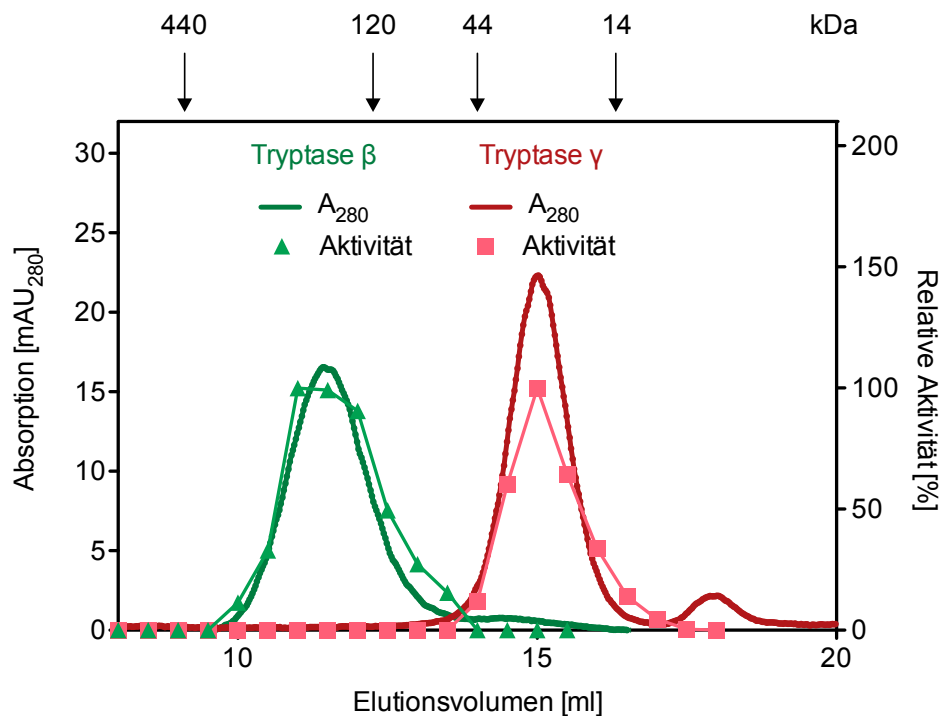


Abb. 5.5-5: Analyse der quaternären Struktur der rhTryptasen γ und β mittels Gelfiltration. Die Tryptasen (100 μ g) wurden auf die Superose 12 Gelfiltrationssäule in einem Puffer mit 1 M NaCl aufgetragen. Die hochmolekulare, tetramere Tryptase β eluiert bei einer Molekularmasse von ca. 130 kDa, rhTryptase γ dagegen mit einer molekularen Masse von ca. 40 kDa. Die Superose 12-Säule war zuvor mit Ferritin (440 kDa), Catalase (120 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Ribonuclease A (14 kDa) kalibriert worden. Nach der Chromatographie

wurde die enzymatische Aktivität in den Elutionsfraktionen (50 μ l) mit den Substraten Z-FR-AMC (10 μ M) und tos-GPR-AMC (5 μ M) gemessen.

5.5.4 Bestimmung der Affinität zu Heparin

Die oligomere Struktur des enzymatisch aktiven Tryptase β -Tetramers ist unter physiologischen Bedingungen von der Bindung des Proteoglykans Heparin abhängig. Um zu überprüfen inwieweit auch rhTryptase γ Heparin binden kann, wurde die Affinität beider Tryptasen zu Heparin mittels Affinitätschromatographie verglichen. Dazu wurden die Tryptasen (je 80 μ g) im Bindungspuffer (0,1 M NaCl, pH 6) auf eine TSKgel Heparin-5PW-Säule (Tosoh) aufgetragen, die anschließend mit einem Salzgradienten (0,1 - 2 M NaCl) eluiert wurde. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Bestimmung der Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt (Abb. 5.5-6). Die rhTryptase γ ist bereits in der Durchlaufraction nachweisbar, bindet also nicht an das immobilisierte Heparin-Glykosaminoglykan. Dagegen eluiert Tryptase β erst bei einer Salzkonzentration von etwa 1 M NaCl von der Säule. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass rhTryptase γ im Vergleich zu Tryptase β eine wesentlich geringere bzw. unter diesen Bedingungen nicht nachweisbare Affinität zu Heparin aufweist.

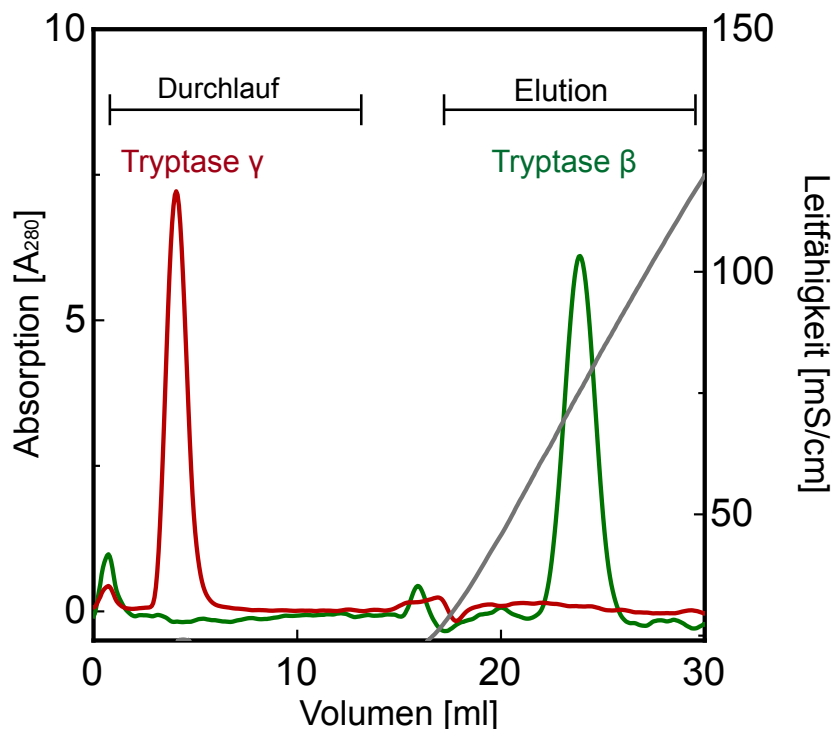


Abb. 5.5-6: Heparinaffinität der rhTryptasen γ und β . Die Tryptasen (je 80 μ g) wurden in einem Puffer mit geringer Ionenstärke auf eine TSKgel Heparin-5PW-Säule aufgetragen und mit einem Salzgradienten eluiert. Tryptase β wird bei 1 M NaCl von der Heparin-Sepharose eluiert und zeigt damit eine hohe Affinität zu Heparin. rhTryptase γ wird in der Durchlaufraction mit geringer Salzkonzentration detektiert und weist damit keine nachweisbare Affinität zu Heparin auf.

5.5.5 Analyse des pH-Optimums

Zur Bestimmung der pH-Optima der enzymatisch aktiven Tryptasen β und γ wurde die Aktivität im pH-Bereich zwischen 3 und 12 bestimmt. Dazu wurden die Proteasen (0,2 und 20 nM Tryptase β bzw. γ) mit 19 Puffern mit den Puffersystemen MES, PO_4^{3-} , Glycin und Tris versetzt; da Heparin für die Stabilität von Tryptase β notwendig ist, wurde rhTryptase γ in Gegenwart und Abwesenheit von Heparin (0,1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde mit den fluorogenen Peptidsubstraten tos-GPR-AMC bzw. Z-FR-AMC (5 und 10 μM) über 10 min bei 37°C gemessen. Tryptase β zeigt ein pH-Optimum zwischen pH 7 und 8 (Abb. 5.5-7). Die rhTryptase γ ist dagegen bei einem breiteren pH-Bereich zwischen pH 5 und 8 enzymatisch aktiv und unabhängig von der Gegenwart von Heparin. Daraus ergibt sich, dass beide Tryptasen im physiologischen pH-Bereich zwischen 7 und 8, d. h. im Extrazellulärraum enzymatisch aktiv sind. Die rhTryptase γ ist zudem im leicht sauren pH aktiv, der dem in Granula der Mastzelle entspricht. Im Gegensatz zur Tryptase β , die durch Heparin stabilisiert wird, ist die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ unabhängig und unbeeinflusst von Heparin.

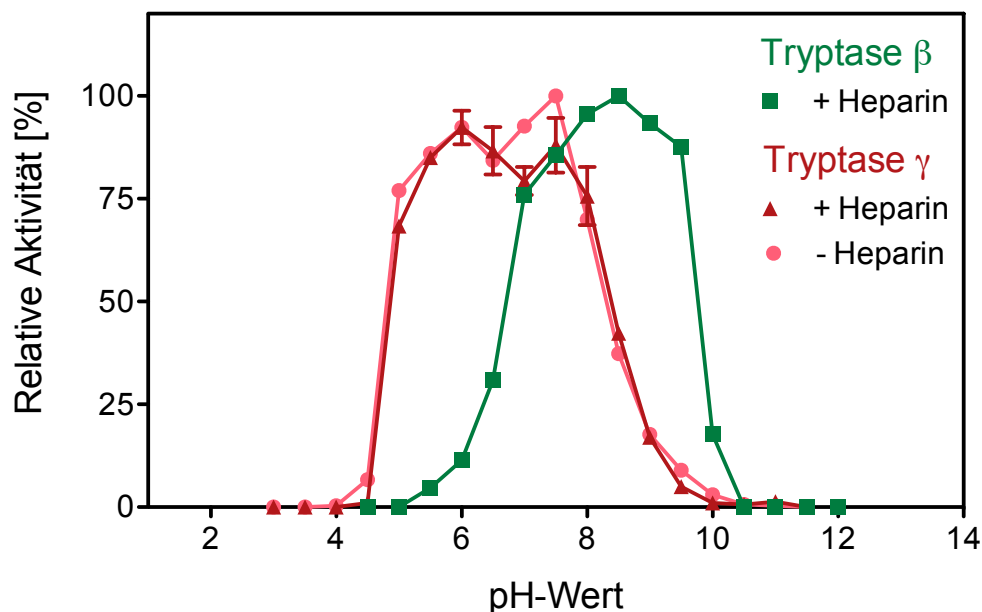


Abb. 5.5-7: Analyse der pH-Optima der rhTryptasen γ und β . Die enzymatische Aktivität der rhTryptasen γ und β (20 bzw. 0,2 nM) bzw. wurde mit fluorogenen Peptidsubstraten Z-FR-AMC bzw. tos-GPR-AMC (10 bzw. 5 μM) bei dem jeweiligen pH-Wert in Gegenwart und Abwesenheit von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Heparin gemessen. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$.

5.5.5.1 Einfluss von Salzen auf die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ

Es wird angenommen, dass die enzymatische Aktivität der Tryptase β in den Granula der Mastzelle durch pH und Heparin sowie durch Histamin und Salze reguliert wird [108]. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die Tryptase γ zu untersuchen, wurde ihr Effekt auf die enzymatische Aktivität analysiert. Dazu wurde die enzymatische Aktivität der rhTryptasen γ und β (20 bzw. 0,2 nM) in Gegenwart steigender Konzentrationen der Salze NaCl, KCl, CaCl_2 und MgCl_2 sowie von Histamin gemessen und die IC_{50} -Werte errechnet (Abb. 5.5-8). Die rhTryptase γ wird von bivalenten Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} mit IC_{50} -Werten von 30 mM bzw. 60 mM etwa um den Faktor 10 stärker gehemmt als durch monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ ($\text{IC}_{50} = 300 - 500$ mM) (Abb. 5.5-8A). Histamin inhibiert die rhTryptase γ mit ähnlichem IC_{50} von 50 mM, d. h. einer Konzentration, die der in Mastzell-Granula entspricht [109]. Tryptase β wird von allen Salzen sowie Histamin mit etwa um den Faktor 10 niedrigeren IC_{50} -Werten gehemmt (Abb. 5.5-8B). Diese Ergebnisse zeigen, dass Tryptase β durch Salze im Bereich physiologischer Konzentrationen beeinflusst wird, während für die Regulation der Tryptase γ nur Histamin relevant erscheint.

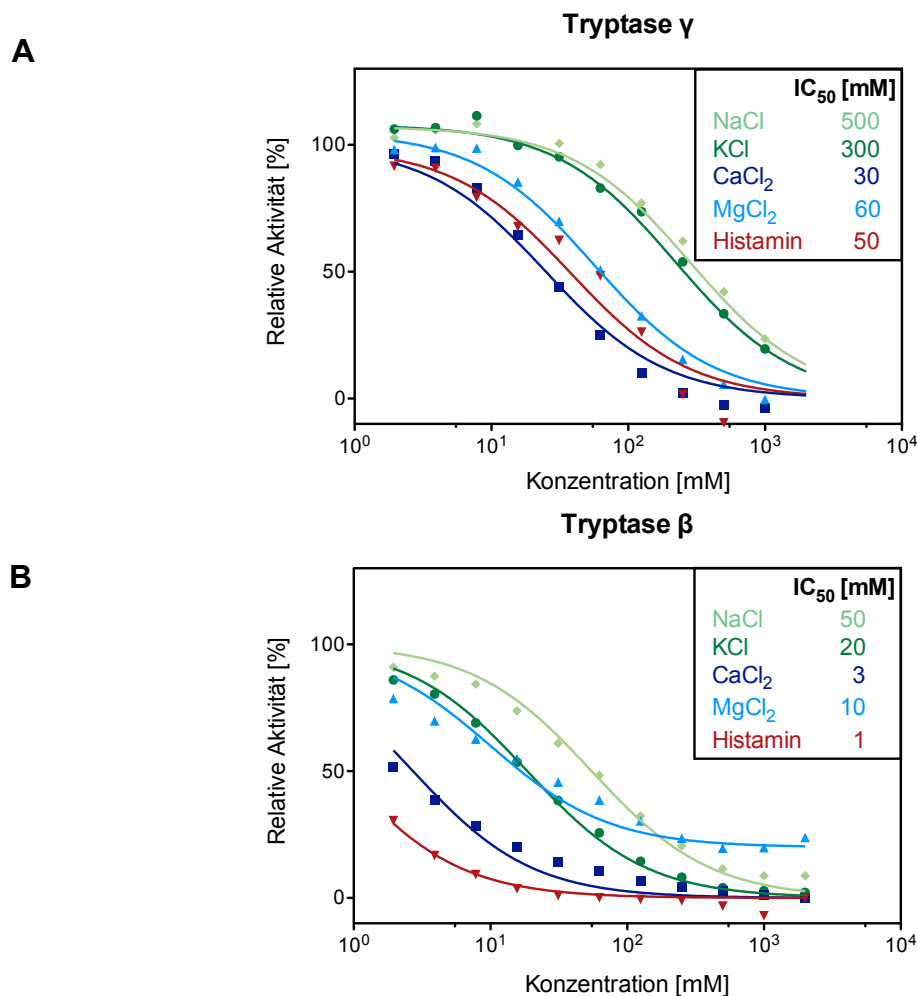


Abb. 5.5-8: Inhibitorische Wirkung von Salzen auf die enzymatische Aktivität der rhTryptasen γ und β . Die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ (A; 20 nM) und β (B: 0,2 nM) wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen mono- und bivalenter Salze sowie Histamin gemessen.

5.5.5.2 Inhibitorische Wirkung des bivalenten Kations Zn^{2+}

Die enzymatische Aktivität der membrangebundenen Serinprotease Prostasin, die ca. 50 % Sequenzidentität zu Tryptase γ besitzt, wird durch das Kation Zn^{2+} reguliert [110]. Um den Einfluss von Zn^{2+} auf die Tryptasen zu untersuchen, wurde ihre enzymatische Aktivität in Abhängigkeit von Zink (0 - 100 μM) und dem pH-Wert (6 und 7,4) bestimmt. Während das bivalente Kation rhTryptase γ sowohl im neutralen pH als auch im sauren pH mit IC_{50} -Werten von 2,4 μM bzw. 5,0 μM hemmt (Abb. 5.5-9), ist die Wirkung gegenüber Tryptase β im neutralen pH etwa 50-fach schwächer (IC_{50} = 101 μM); im sauren pH-Bereich ist die Tryptase β enzymatisch weitgehend inaktiv. Damit liegt der IC_{50} -Wert gegenüber rhTryptase γ im Bereich der Zn^{2+} -Konzentration von 10 - 18 μM im Blut [111, 112] und kann damit physiologisch relevant sein.

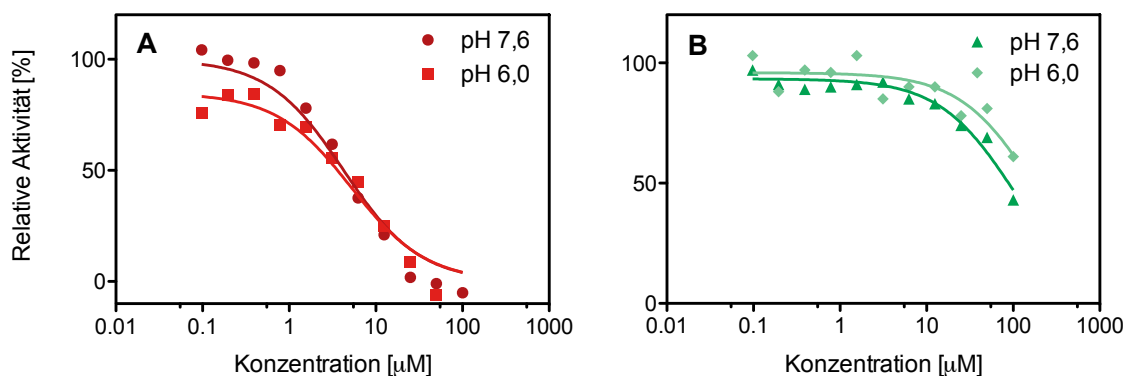


Abb. 5.5-9: Einfluss von Zn^{2+} auf die enzymatische Aktivität der rhTryptasen γ und β . Die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ (20 nM; **A**) und Tryptase β (0,2 nM; **B**) wurde in Abhängigkeit steigender Zn^{2+} -Konzentrationen (0 - 100 μM) bei pH 7,6 und 6,0 gemessen.

5.5.6 Substratspezifität

Aufgrund von Sequenzvergleichen der Tryptase γ mit den anderen Tryptasen und Trypsin, der katalytischen Triade (His78, Asp125, Ser222, Tryptase γ -Nummerierung) sowie des Asp216 (Tryptase γ -Nummerierung bzw. Asp189 Chymotrypsin-Nummerierung) [25] wird Tryptase γ zu den Trypsin-ähnlichen Serinproteasen gerechnet. Diese Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminal von basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin, die aufgrund des Asp189 (Chymotrypsin-Nummerierung) gut in die S1-Bindungstasche binden. Die Interaktion der Aminosäuren aminoterminal der Schnittstelle im Substrat mit den S2-S4-Bindungstaschen modifiziert die Affinität zwischen Substrat und Protease und definiert die erweiterte Substratspezifität der Protease. Zur Bestimmung der Trypsin-ähnlichen proteolytischen Aktivität der rhTryptase γ wurde zunächst die Spaltung fluorogener Peptidsubstrate mit verschiedenen Aminosäureresten an P1 untersucht und anschließend die erweiterte Substratspezifität mit *Position Scanning Libraries* analysiert.

5.5.6.1 Untersuchung der Substratspezifität in der S1-Bindungstasche

Um die S1-Spezifität der rhTryptase γ im Vergleich zur Tryptase β zu untersuchen, wurde die Spaltung von fluorogenen Peptidsubstraten mit verschiedenen Aminosäureresten an P1 verglichen. Dazu wurde die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ (20 nM) und der Tryptase β (0,2 nM) mit den Substraten (5 μ M) über 10 min bei 37°C bestimmt und die relativen Aktivitäten miteinander verglichen (Abb. 5.5-10). Die rhTryptase γ spaltet wie auch Tryptase β Substrate mit basischen Resten an P1 und zeigt keine Aktivität gegenüber Substraten des Chymotrypsins (P1 = F, Y), der Elastase (P1 = V) oder des Cathepsin C (H-GF). Die rhTryptase γ spaltet primär Substrate mit Arginin, nicht aber Lysin, an P1. Insbesondere die Substrate Z-FR-AMC und Boc-QAR-AMC werden mit hoher Aktivität gespalten. Dagegen akzeptiert Tryptase β Substrate mit Arginin als auch Lysin an P1 und zeigt die höchste enzymatische Aktivität mit den Substraten Boc-QAR-AMC und Z-AAK-AMC. Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass rhTryptase γ als tryptische Serinprotease enzymatisch aktiv ist, die an P1 Arginin über Lysin deutlich bevorzugt, während Tryptase β beide Aminosäuren akzeptiert. Darüber hinaus konnten unter diesen Substraten Kandidaten identifiziert werden, die von beiden Trypsasen gespalten werden (Boc-QAR-AMC) bzw. mit denen zwischen den Trypsasen differenziert werden kann (Z-FR-AMC und Z-AAK-AMC für rhTryptase γ bzw. Tryptase β). Der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten bezogen auf die Proteasekonzentration zeigt jedoch, dass rhTryptase γ gegenüber dem Substrat Boc-QAR-AMC um den Faktor 50 weniger aktiv ist als Tryptase β (0,8 bzw. 40 nM AMC/min/nM Protease).

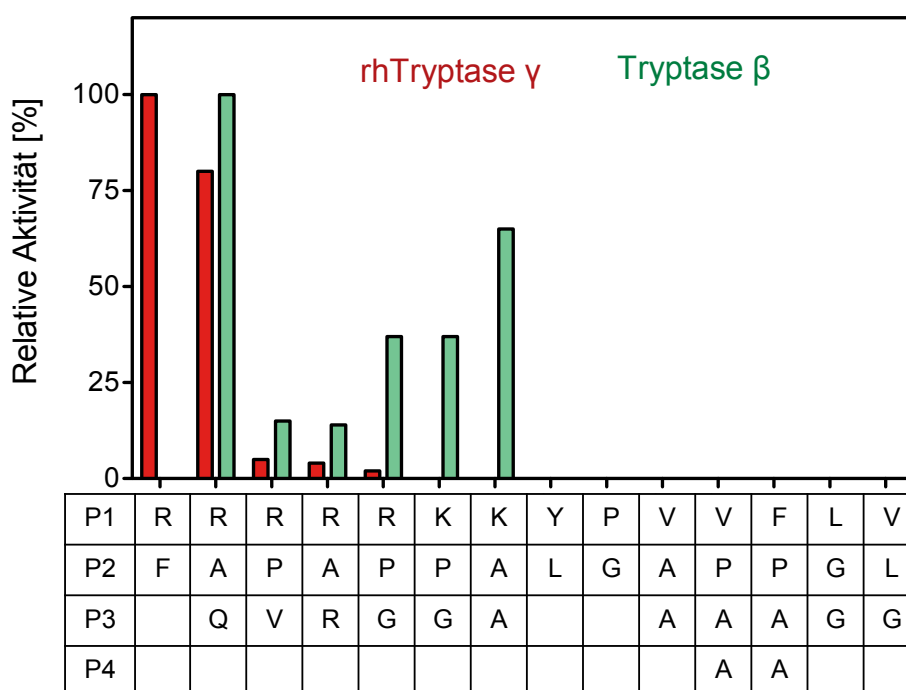


Abb. 5.5-10: Analyse der Spezifität an Position P1 der rhTrypsasen γ und β . Die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ (20 nM) und der Tryptase β (0,2 nM) wurde mit den Substraten (je 5 μ M) über 10 min bei 37°C bestimmt und auf die höchste Aktivität der jeweiligen Tryptase normiert. SG Schutzgruppe.

5.5.6.2 Analyse der Substratspezifität mittels *Position Scanning Libraries*

Um die erweiterte Substratspezifität der rhTryptase γ im Vergleich zur Tryptase β zu definieren, wurden *Position Scanning Libraries* (M. Drag, Universität Wrocław) verwendet. Diese Bibliotheken wurden für die Analyse Trypsin-ähnlicher Serinproteasen synthetisiert und tragen deshalb an Position P1 einen Argininrest. Zur Analyse der P2-Position („P2-Bibliothek“) ist der Aminosäurerest an Position P2 definiert, an den anderen Positionen P3 und P4 liegen dagegen äquimolare Mischungen der 18 natürlich vorkommenden Aminosäuren vor (Abb. 5.5-11); Cystein wurde aufgrund der hohen Oxidationsfähigkeit nicht verwendet und Methionin durch Norleucin ersetzt. Die P3- und P4-Bibliotheken sind analog aufgebaut. Als Fluorophor, dass durch die Prozessierung freigesetzt wird, dient ACC (7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin).

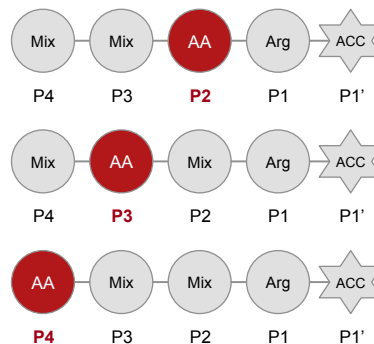


Abb. 5.5-11: Schematische Darstellung der Substratbibliotheken. An Position P1 und an P1' ist ein Argininrest bzw. das ACC-Molekül konstant gehalten. Zur Analyse der Spezifität an Position PX sind die Reste an dieser Stelle definiert (rot markiert), die anderen beiden Reste bestehen aus einem äquimolaren Gemisch der 18 natürlichen Aminosäuren. AA Aminosäure.

Für die Bestimmung der Spezifität wurde die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ (1 nM) und der Tryptase β (0,5 nM) mit den jeweiligen Substratbibliotheken (je 5 μ M) bei physiologischem pH über 30 min bei 37°C gemessen und auf die höchste Aktivität normalisiert (Abb. 5.5-12). Die rhTryptase γ akzeptiert an Position P2 nahezu ausschließlich große aromatische Aminosäurereste wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Dagegen favorisiert Tryptase β hier v. a. Substrate mit kleinen polaren Gruppen wie etwa Asparagin, Histidin, Serin und Threonin. Beide Tryptasen bevorzugen an P3 Substrate mit basischen Resten wie Arginin und Lysin; rhTryptase γ akzeptiert an dieser Position außerdem polare Reste wie Serin und Threonin deutlich besser als Tryptase β . Substrate mit den Resten Aspartat und Prolin an P3 werden von keiner Tryptase gespalten. Beide Tryptasen bevorzugen Substrate mit Prolin an Position P4. Während Tryptase β noch eine Reihe anderer Aminosäurereste an P4 akzeptiert, toleriert rhTryptase γ nur wenige Reste u. a. Isoleucin und Valin. Insgesamt unterscheidet sich die Substratspezifität der Tryptasen maßgeblich an Position P2, sodass sich die Präferenzen der Tryptasen an dieser Position ergänzen und die Tryptasen synergistisch Substrate mit jedem Aminosäurerest bis auf Arginin an P2 spalten können. Dagegen zeigen die beiden Tryptasen weniger Unterschiede in der Substratspezifität an den Positionen P3 und P4.

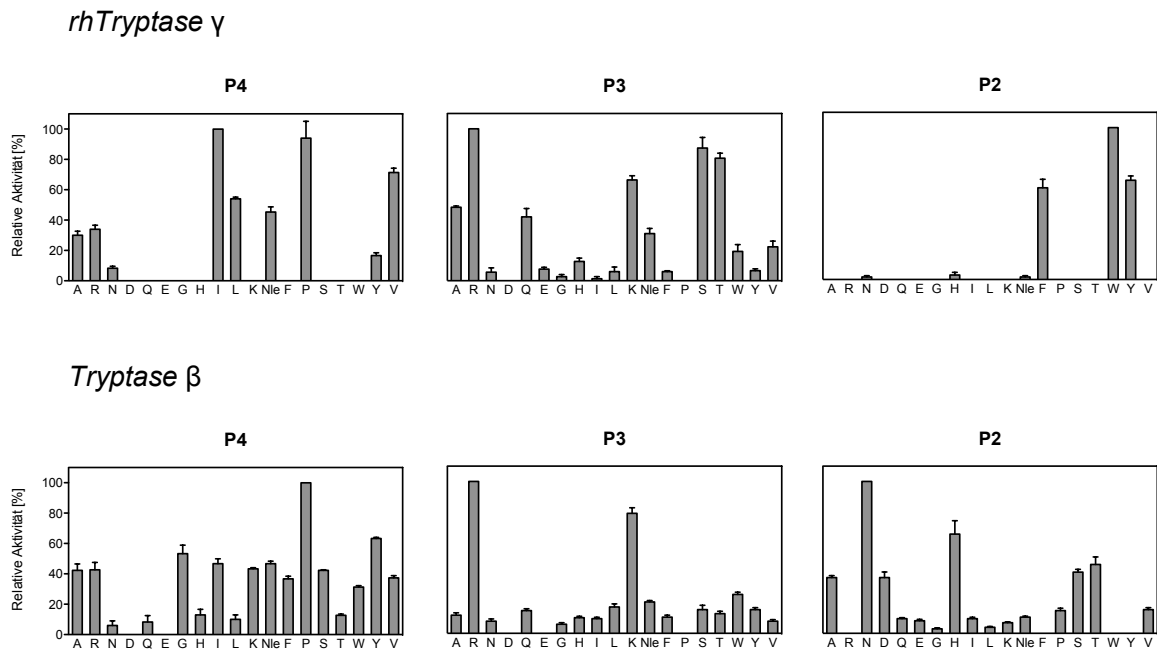


Abb. 5.5-12: Bestimmung der erweiterten Substratspezifität der *rhTryptasen* γ und β . Die enzymatische Aktivität der *rhTryptase* γ (1 nM) und β (0,5 nM) wurde mit den Peptidsubstraten (5 μ M) natürlich vorkommender Aminosäuren an P2, P3 und P4 gemessen. Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$.

5.5.7 Prozessierung (patho)physiologisch relevanter Substrate

Die (patho)physiologischen Effekte der Tryptase β werden u. a. auf die Spaltung von Peptidsubstraten und makromolekularen Substraten zurückgeführt. Dazu gehören Neuropeptide wie das VIP (*Vasoactive intestinal peptide*), das CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*) sowie das PHM (*Peptide Histidin-Methionin*), Plasmaproteine wie Fibrinogen und Kininogen sowie Zymogene anderer Proteasen wie pro-uPA. Um die potenzielle Rolle der Tryptase γ in diesen Prozessen zu analysieren, wurde die Prozessierung einiger dieser physiologisch relevanten Substrate durch beide Tryptasen verglichen.

5.5.7.1 Prozessierung von Peptidsubstraten

Um die Spaltung der Neuropeptide VIP, CGRP und PHM durch die Tryptasen zu vergleichen, wurden die Peptide (40 - 50 μ M) mit *rhTryptase* γ (50 nM) bzw. Tryptase β (1 nM) bis zu 3 h bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Reaktionsansätze mit Trifluoressigsäure (TFA; 0,1 % Endkonz., pH 3,5) abgestoppt. Die Bildung von Spaltprodukten wurde mittels der *Reversed Phase* HPLC-Chromatographie (LiChrospher WP 300 RP-18, Merck) analysiert. Dazu wurden Proben (100 μ l) der Ansätze auf die HPLC-Säule aufgetragen, die Peptide mit einem acetonitrilhaltigen Elutionspuffer (Acetonitril LiChrosolv, 0,06 % TFA) in einem Gradienten eluiert und bei einer Absorptionswellenlänge von 206 nm detektiert.

Das Peptid CGRP wird nach Inkubation mit Tryptase β (Abb. 5.5-13B) innerhalb von 30 min nahezu vollständig in die Fragmente A, B, C und D gespalten (Abb. 5.5-13A) [113]. Die folgende Inkubation bis zu drei Stunden führt zur weiteren Prozessierung der Intermediärprodukte und zum kompletten Abbau des CGRP. Durch Inkubation des CGRP mit rhTryptase γ (Abb. 5.5-13B) werden dagegen nur zwei Fragmente gebildet, die mit den initialen Spaltprodukten A und D der Tryptase β co-eluieren. Die Menge dieser Fragmente nimmt über die Zeit zu, eine weitere Degradierung ist trotz des zusätzlichen Argininrestes in der Peptidsequenz jedoch nicht zu beobachten. Dies zeigt, dass rhTryptase γ in der Lage ist, CGRP an der Schnittstelle SR-SGG (roter Pfeil in Abb. 5.5-13A) zu spalten, jedoch verläuft die Prozessierung unter Berücksichtigung der Proteasekonzentration (50 nM vs. 1 nM) und der Inkubationszeit um den Faktor > 300-fach langsamer als mit Tryptase β .

Die Inkubation des Peptids PHM mit Tryptase β (Abb. 5.5-14B) führt über die Zeit zur Bildung der zwei Fragmente A und B aufgrund der Spaltungsstelle SAK-KYL (grüner Pfeil in Abb. 5.5-14A). Dagegen ist nach Inkubation mit rhTryptase γ lediglich ein minimales Degradierungsprodukt nach drei Stunden nachweisbar (schwarzer Pfeil), das mit Fragment B co-eluiert. Auch das Peptid VIP wird durch die Tryptase β (Abb. 5.5-14D) innerhalb von drei Stunden vollständig gespalten; durch rhTryptase γ ist dagegen keine Prozessierung nachweisbar.

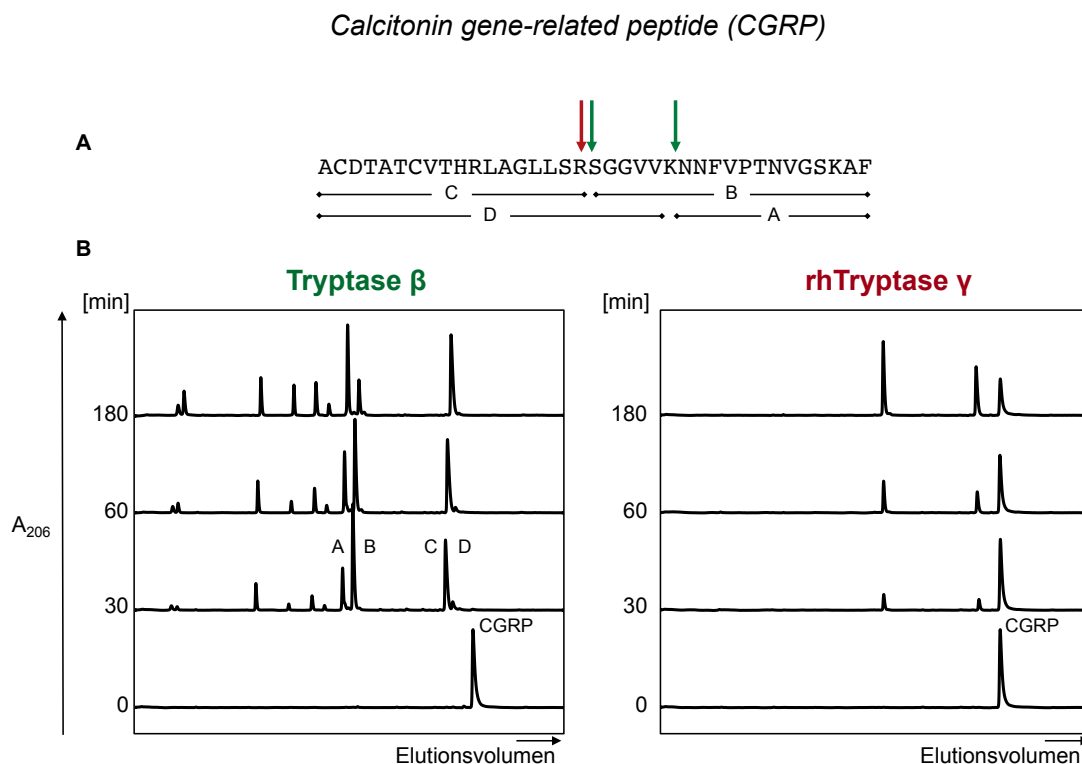


Abb. 5.5-13: Prozessierung des Calcitonin gene-related peptide durch Tryptasen. **A)** Aminosäuresequenz des CGRP mit Schnittstellen der Tryptase β (grün; [113]) und rhTryptase γ (rot). **B)** Nachweis der Spaltprodukte nach Inkubation des CGRP (50 μ M) mit Tryptase β (1 nM) und rhTryptase γ (50 nM) mittels HPLC.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass rhTryptase γ prinzipiell zur Spaltung physiologisch relevanter Peptidsubstrate fähig ist. Die Spaltung verläuft jedoch wesentlich langsamer und einige der Peptidsubstrate der Tryptase β werden durch rhTryptase γ nicht prozessiert.

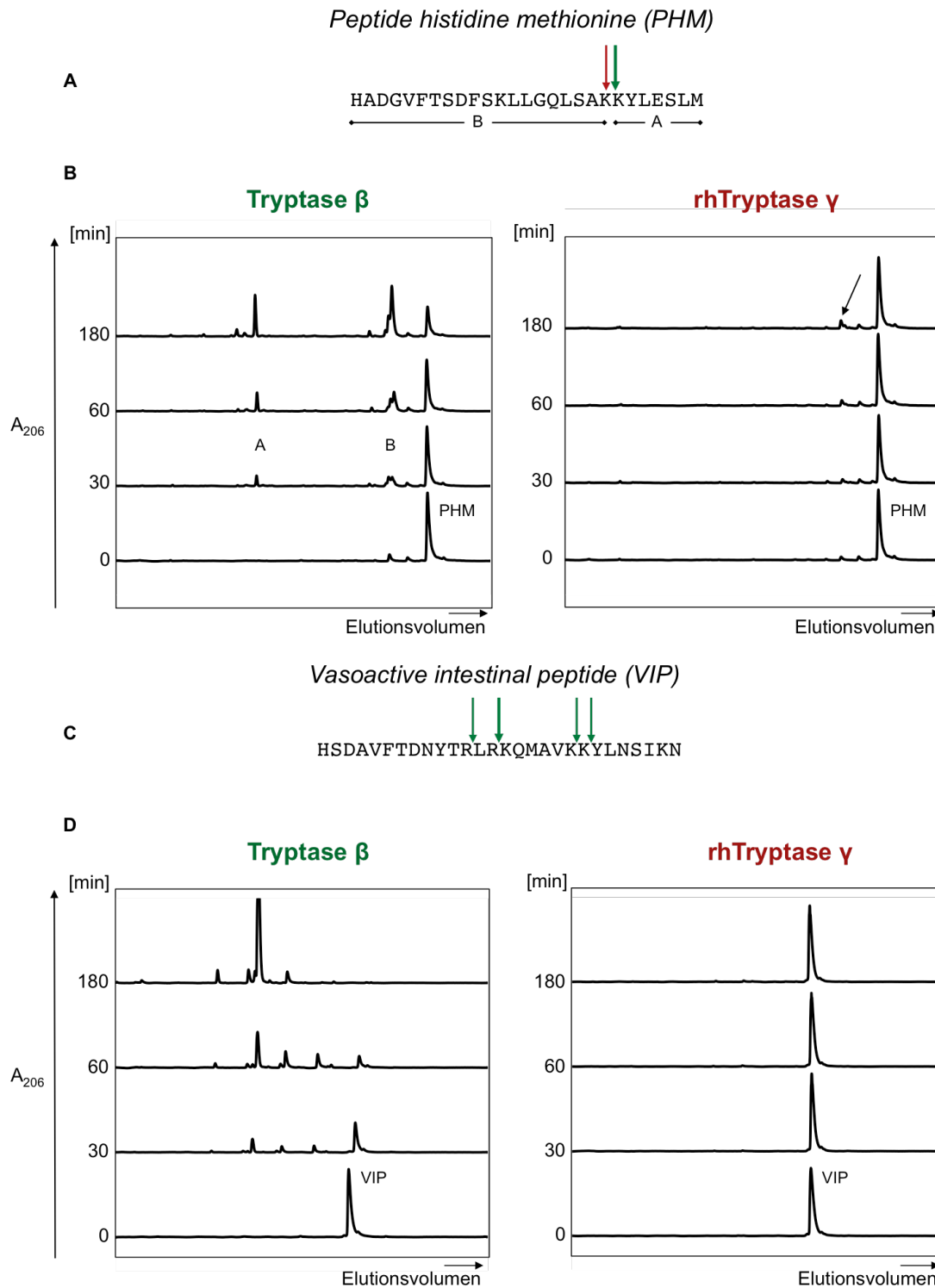


Abb. 5.5-14: Prozessierung von Neuropeptiden durch die rhTryptasen γ und β . **A)** Peptidsequenz des PHM mit Schnittstellen der Tryptase β und rhTryptase γ (grüner bzw. roter Pfeil). **B)** Nach Inkubation des PHMs (50 μM) mit Tryptase β (1 nM) und rhTryptase γ (50 nM) wurden die Spaltprodukte mittels HPLC untersucht. **C)** Aminosäuresequenz des VIP mit den Spaltstellen der Tryptase β (grüne Pfeile). **D)** Nach dreistündiger Inkubation des VIPs (40 μM) mit Tryptase β (1 nM) und rhTryptase γ (50 nM) wurden die Spaltprodukte mittels HPLC getrennt und über die Absorption bei 206 nm detektiert.

5.5.7.2 Prozessierung (patho)physiologisch relevanter Proteinsubstrate

5.5.7.2.1 Spaltung von Modellproteinen durch rhTryptase γ

Um nachzuweisen, ob rhTryptase γ neben Peptidsubstraten auch Proteinsubstrate spalten kann, wurde die Prozessierung von Modellproteinen wie Prothrombin, Fibrinogen, (sc-HMW-) Kininogen und Casein untersucht. Dazu wurden die Proteine (je 4 μ g) vier Stunden mit rhTryptase γ (0,4 μ g) bei 37°C und physiologischem pH inkubiert und anschließend die Bildung von Spaltprodukten mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 5.5-15). Die Inkubation des Caseins (ca. 35 kDa) mit rhTryptase γ führt zur kompletten Spaltung innerhalb von vier Stunden und zu einer Reihe von Fragmenten mit geringerer Molekularmasse. Das Kininogen (ca. 120 kDa) wird durch rhTryptase γ dagegen zu zwei Spaltprodukten mit einer Molekülmasse zwischen 60 und 84 kDa prozessiert. Auch Fibrinogen wird durch rhTryptase γ prozessiert (s. a. Abb. 5.5-16), während eine Spaltung des Prothrombins über diesen Zeitraum nicht nachweisbar ist. Diese Untersuchung zeigt, dass rhTryptase γ in der Lage ist, physiologisch relevante Proteinsubstrate zu prozessieren.

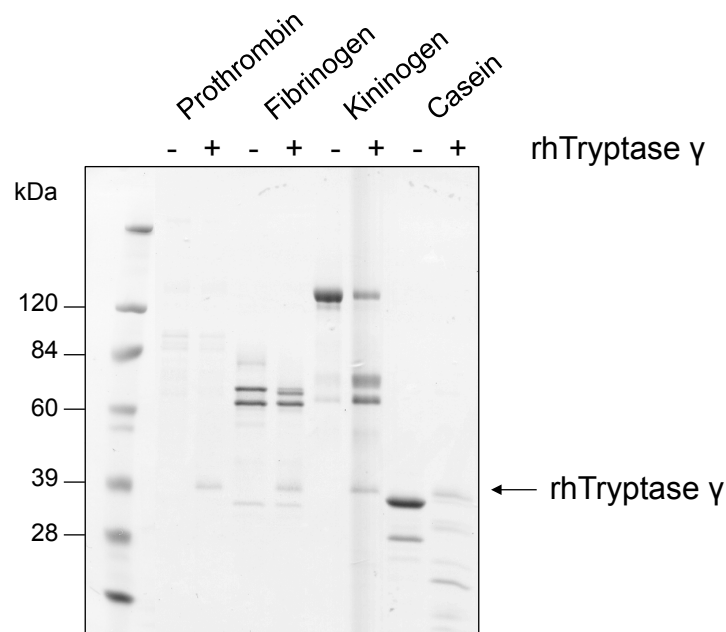


Abb. 5.5-15: Prozessierung von Proteinsubstraten durch rhTryptase γ . Nach vierstündiger Inkubation der Proteine (4 μ g) mit rhTryptase γ (0,4 μ g) bei 37°C wurde die Bildung von Spaltprodukten mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Es sind Spaltprodukte mit Fibrinogen, Kininogen und Casein zu beobachten.

5.5.7.2.2 Prozessierung von Fibrinogen und Kininogen

Um die Prozessierung von Fibrinogen und Kininogen durch rhTryptase γ und Tryptase β zu vergleichen, wurden die Proteine (40 μ g) mit den Tryptasen (0,8 μ g) bzw. mit Puffer als Kontrolle über 24 h bei 37°C inkubiert und die Ansätze mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 5.5-16). Isoliertes Fibrinogen – ein aus Blutplasma gewonnenes Protein – ist unter diesen Bedingungen nicht völlig stabil, wie die Abnahme der Bandenintensität über die Zeit zeigt. Tryptase β spaltet innerhalb von 15 min das α -Doublet (66 kDa) in ein α -Fragment (2 grüne Sterne) und baut innerhalb von 24 h die α - sowie die β -Kette

(52 kDa) vollständig ab. Die Inkubation mit rhTryptase γ führt erst über 24 Stunden zum Abbau des α -Doublets und zur Prozessierung der β -Kette zu einem β -Fragment (roter Stern). Die γ -Kette (46 kDa) bleibt auch in Gegenwart der Tryptasen über die Zeit weitgehend stabil.

Die Inkubation des sc-HMW-Kininogens mit Tryptase β führt schon nach 30 min zum Verlust der Hauptbande (ca. 120 kDa) und zu zwei neuen Banden bei ca. 83 kDa und 40 kDa (Abb. 5.5-17). Nach 24 h ist eine weitere Prozessierung beider Spaltprodukte zu sehen. Dagegen führt die Inkubation des Kininogens mit rhTryptase γ wesentlich langsamer zur Abnahme der Bandenintensität der hochmolekularen Kette (120 kDa); zwei Spaltprodukte (ca. 50 kDa) sind allerdings bereits nach 30 min nachweisbar. Innerhalb von 24 Stunden entstehen weitere Fragmente mit molekularen Massen < 47 kDa. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation des Fibrinogens und des sc-HMW-Kininogens mit den beiden Tryptasen zu unterschiedlichen Spaltprodukten führt. Jedoch verläuft bei beiden Proteinen die Prozessierung durch rhTryptase γ langsamer.

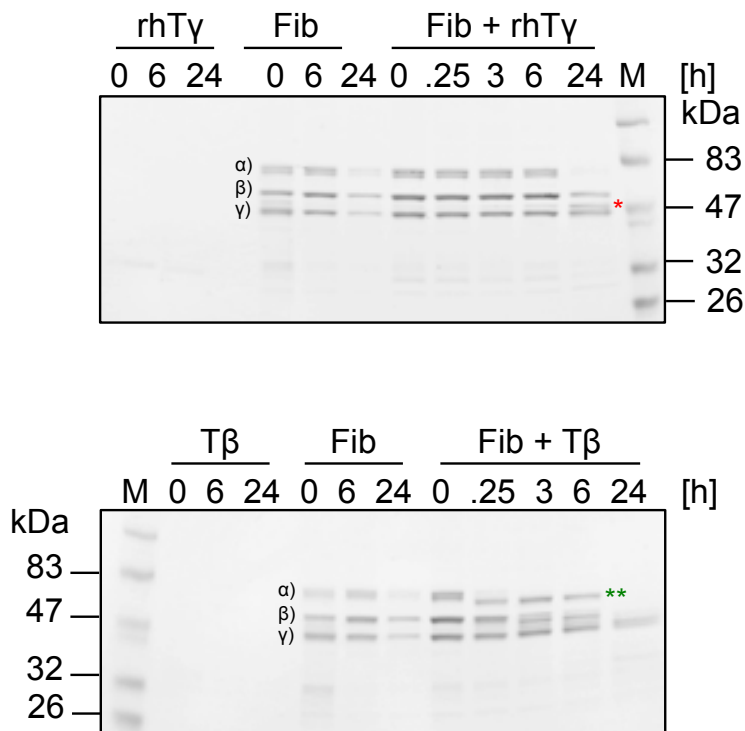


Abb. 5.5-16: Prozessierung des Fibrinogens durch Tryptasen. Nach Inkubation des Fibrinogens (400 ng/ μ l) mit den Tryptasen (8 ng/ μ l) bei 37°C wurden Proben (10 μ l) zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Beide Tryptasen prozessieren das Fibrinogen, jedoch mit unterschiedlichem Spaltungsmuster.

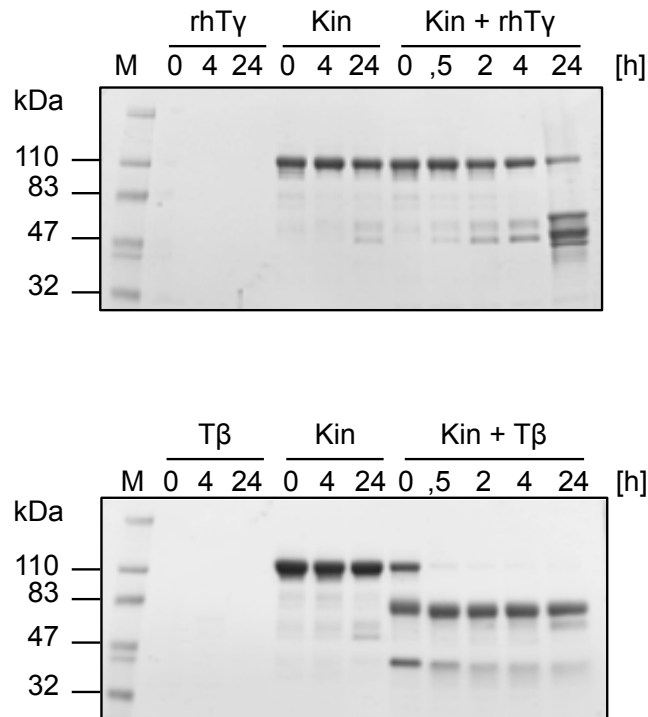


Abb. 5.5-17: Prozessierung des sc-HMW-Kininogens mit rhTryptase γ und β . Nach Inkubation des sc-HMW-Kininogens (400 ng/ μ l) mit den Tryptasen (8 ng/ μ l) über 24 h bei 37°C wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten Proben (10 μ l) entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Der Abbau des hochmolekularen Proteins ist durch beide Tryptasen mit unterschiedlichen Degradierungsprodukten zu beobachten.

5.5.7.2.3 Aktivierung des pro-u-Plasminogen Aktivators (pro-uPA)

Um die Prozessierung von Zymogenen wie des pro-uPAs durch die rhTryptase γ zu untersuchen, wurde pro-uPA (1 μ M) mit Plasmin (0,1 nM) und mit rhTryptase γ (100 nM) bis zu 30 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde die enzymatische Aktivität des uPAs mit dem Substrat Boc-LGR-AMC (20 μ M) gemessen (Abb. 5.5-18). Die Inkubation des pro-uPAs mit rhTryptase γ (Abb. 5.5-18) führt zu einem leichten Anstieg der enzymatischen Aktivität, die sich von der des unbehandelten Zymogens und der rhTryptase γ allein deutlich unterscheidet. Die Behandlung des pro-uPAs mit Plasmin (Abb. 5.5-18) führt dagegen zu einem deutlichen Anstieg der enzymatischen Aktivität über die Zeit.

Um die Prozessierung des Zymogens mittels SDS-PAGE zu untersuchen, wurde pro-uPA (10 μ g) mit den aktiven Proteasen Plasmin, Thrombin, Tryptase β und rhTryptase γ (je 0,4 μ g) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bildung von Spaltprodukten mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 5.5-19). Pro-uPA alleine ist über die Zeit stabil. Die Zugabe von Plasmin und Thrombin führt innerhalb von kurzer Zeit (0 min) zur kompletten Prozessierung des Zymogens (ca. 45 kDa) zur reifen Form mit einer Molekülmasse von ca. 31 kDa (Pfeil). Durch Inkubation mit den Tryptasen wird ebenfalls die Bande der reifen Form sichtbar, jedoch mit geringerer Intensität. Demnach sind beide Tryptasen in der Lage das Zymogen pro-uPA zur reifen Form zu prozessieren, jedoch verläuft die Reaktion langsamer als mit Plasmin und Thrombin.

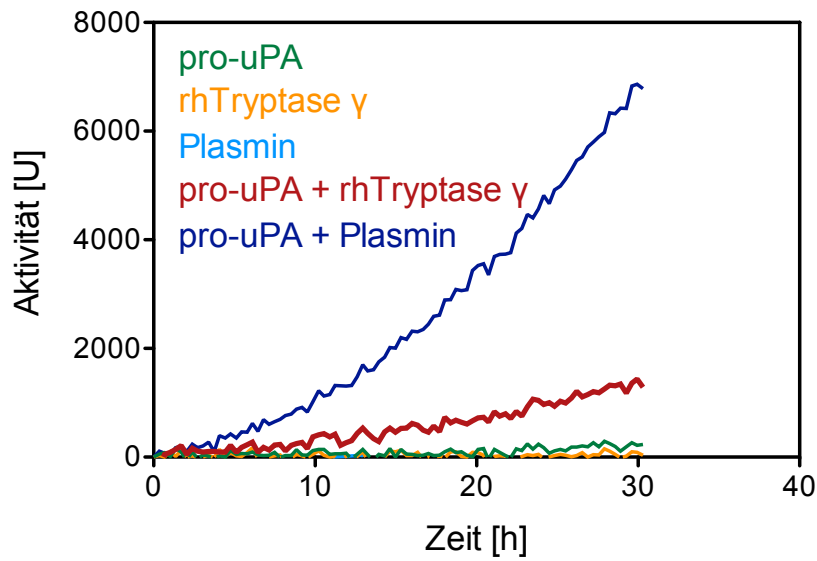


Abb. 5.5-18: Prozessierung des pro-uPAs mit Plasmin und rhTryptase γ . Die Inkubation des pro-uPAs ($1 \mu\text{M}$) mit Plasmin ($0,1 \text{ nM}$) und rhTryptase γ (100 nM) führt über die Zeit zu steigender enzymatischer Aktivität mit dem Substrat Boc-LGR-AMC ($20 \mu\text{M}$).

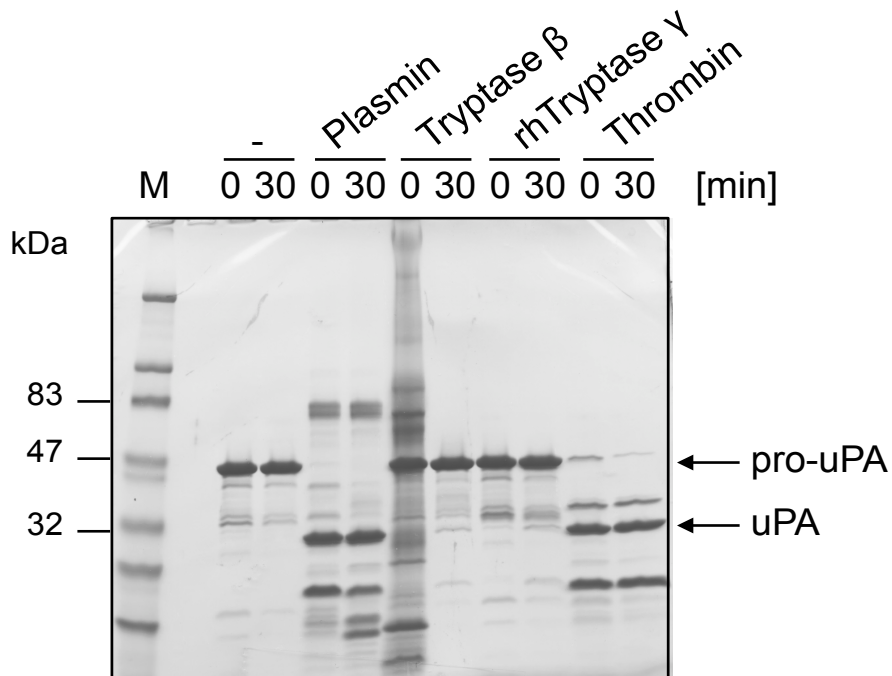


Abb. 5.5-19: Analyse der pro-uPA-Prozessierung mittels SDS-PAGE. Nach Inkubation des pro-uPAs ($10 \mu\text{g}$) mit den reifen Proteasen Plasmin, Tryptase β , rhTryptase γ und Thrombin (je $0,4 \mu\text{g}$) über 30 min bei 37°C wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten Proben ($10 \mu\text{l}$) entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

5.5.8 Hemmkinetische Charakterisierung

5.5.8.1 Klassifizierung des proteolytischen Mechanismus der rhTryptase γ

Basierend auf multiplen Sequenzvergleichen wird die Tryptase γ der Chymotrypsin-Familie der Serinproteasen (Merops Clan PA, Familie S1) zugeordnet (s. a. Abb. 6.2-1). Zur funktionellen Verifizierung des katalytischen Mechanismus wurde der Einfluss von sog. klassenspezifischen Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität analysiert. Dazu wurden die Tryptasen γ und β (20 bzw. 0,2 nM) mit den Inhibitoren inkubiert, die enzymatische Restaktivität bestimmt und die prozentuale Inhibition berechnet (Tab. 5.5-1). Beide Tryptasen werden von den Serinproteaseinhibitoren Pefabloc SC und PMSF gehemmt, die kovalent an den Serinrest der katalytischen Triade (H57, D102, S195) binden; die Inhibition der rhTryptase γ mit PMSF ist nach einer Stunde nicht vollständig, steigt jedoch über die Zeit an. Im Gegensatz dazu haben der Cysteinproteaseinhibitor E64 sowie die Metalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin, EDTA und EGTA keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Tryptasen. Diese Wirkung der verschiedenen Inhibitoren bestätigt, dass rhTryptase γ den katalytischen Mechanismus einer Serinprotease aufweist.

Tab. 5.5-1: Hemmung der enzymatischen Aktivität der Tryptasen durch Inhibitoren. Nach einstündiger Inkubation der Tryptasen mit den jeweiligen Inhibitoren bei 37°C wurde die enzymatische Restaktivität der rhTryptasen γ (20 nM) und β (0,2 nM) mit dem Substrat Z-FR-AMC (10 μ M) bzw. tos-GPR-AMC (5 μ M) gemessen. Beide Tryptasen werden durch Serinproteaseinhibitoren gehemmt, nicht aber durch Hemmstoffe von Proteasen anderer mechanistischer Klassen. Mittelwerte \pm SEM, n=3.

Inhibitor	Konzentration [mM]	Klasse	Inhibition [%]	
			rhTryptase γ	Tryptase β
PMSF	10	Serin	50 \pm 5	100 \pm 5
Pefabloc SC	10	Serin	100 \pm 5	100 \pm 5
E64	0,01	Cystein	0	3 \pm 1
1,10-Phenanthrolin	0,1	Metallo	0	0,5 \pm 0,1
EDTA	10	Metallo	0	14 \pm 2
EGTA	10	Metallo	0	14 \pm 2

5.5.8.2 Interaktion von Inhibitoren mit rhTryptase γ

Zur Identifizierung von Inhibitoren, die rhTryptase γ hemmen, wurden natürlich vorkommende und synthetische Inhibitoren tryptischer Proteasen (n=109) sowie Tryptase β -Inhibitoren, die in Kooperation mit der Fa. Altana (Konstanz; n=790) und mit N. Schaschke (Aalen; n=55) entwickelt wurden, untersucht. Dazu wurde die rhTryptase γ (20 nM) mit den Inhibitoren (100 μ M) eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die enzymatische Aktivität bestimmt. Nach Inkubation mit den Tryptase β -Inhibitoren konnte keine signifikante Hemmung (< 10 %) der rhTryptase γ gemessen werden. Dagegen wurden acht der 109 reversiblen Inhibitoren tryptischer Proteasen identifiziert, die rhTryptase γ signifikant hemmen. Zur Charakterisierung wurden die Dissoziationskonstanten dieser Inhibitoren im Vergleich zur Tryptase β bestimmt. Dazu wurden die Tryptasen mit steigenden Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert und anschließend die Restaktivität gemessen. Mit Hilfe der

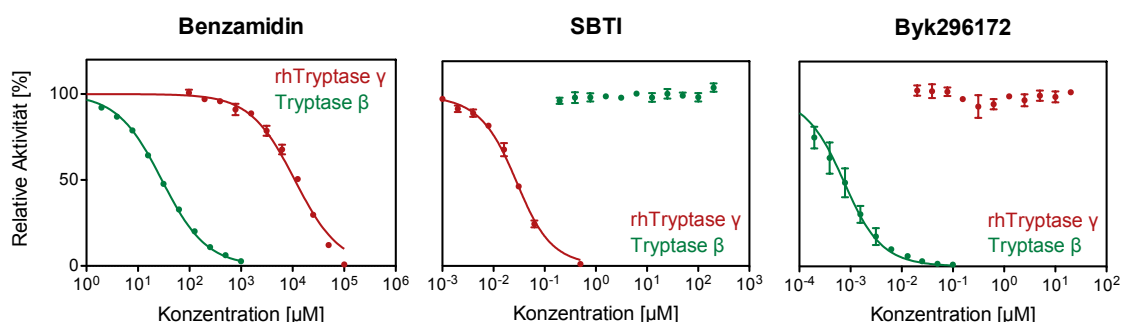


Abb. 5.5-20: Interaktion von Tryptasen mit Inhibitoren. Nach einstündiger Inkubation der rhTryptase γ (20 nM) und Tryptase β (0,2 nM) mit steigenden Konzentrationen von Benzamidin, SBTI und Byk296172 wurde die enzymatische Aktivität gemessen und die relative Aktivität berechnet. Mittelwerte \pm SD, $n=3$.

Morrison-Gleichung wurden die sigmoidalen Kurven angepasst und die jeweilige Dissoziationskonstante K_i für den Enzym-Inhibitor-Komplex berechnet (Abb. 5.5-20, Tab. 5.5-2). Die rhTryptase γ wird im Gegensatz zu Tryptase β von makromolekularen Inhibitoren mit einer molekularen Masse ≥ 15 kDa wie SBTI und Ecotin, sowie deutlich schwächer auch von LBTI gehemmt. Dieses Ergebnis entspricht der Vorstellung, dass Tryptase γ als Monomer und Tryptase β als Tetramer enzymatisch aktiv ist. Wenige niedermolekulare Inhibitoren und Miniproteine, wie Antipain, APC-366 sowie Arg15-Aprotinin hemmen beide Tryptasen mit ähnlichen Affinitäten. In dieser Gruppe fällt APC-366 auf, das als Tryptase β -spezifischer Inhibitor publiziert und u. a. zur Charakterisierung der biologischen Funktion der Tryptase β verwendet wurde [114, 115]. Interessanterweise hemmen kleine, unspezifische Inhibitoren tryptischer Proteasen wie Benzamidin, Gabexat mesylat sowie Nafamostat mesylat die rhTryptase γ um den Faktor 100 - 100.000 schlechter als Tryptase β . Die Inhibitoren rLDTI und Byk296172, in unserer Arbeitsgruppe identifizierte und entwickelte Tryptase β -Inhibitoren, hemmen rhTryptase γ auch in hohen Konzentrationen (≥ 10 μ M) nicht und sind damit weiterhin als Tryptase β -spezifisch anzusehen. Auffällig ist, dass keine der Tryptasen von Aprotinin, einem unspezifischen Inhibitor tryptischer Proteasen, gehemmt wird.

Tab. 5.5-2: Dissoziationskonstanten der Inhibitoren gegenüber den Tryptasen. Nach einstündiger Inkubation der rhTryptase γ (20 nM) und Tryptase β (0,2 nM) mit den Inhibitoren wurde ihre enzymatische Restaktivität gemessen und die Dissoziationskonstanten bestimmt. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. * $n=2$; ** keine Inhibition bei angegebener Konzentration.

Inhibitor	Dissoziationskonstante K_i [μ M]					
	rhTryptase γ			Tryptase β		
SBTI	0,02	\pm	0,001	>> 200**		
Ecotin	0,02	\pm	0,002	>> 10**		
LBTI	53	\pm	5	>> 200**		
Arg15-Aprotinin*	6	\pm	0,8	13	\pm	4
APC-366	81	\pm	7	22	\pm	7
Antipain	36	\pm	3	0,9	\pm	0,3
Benzamidin	11000	\pm	100	29	\pm	0,7
Gabexat mesylat	28	\pm	9	0,05	\pm	0,02
Nafamostat mesylat	1,4	\pm	0,3	0,00002	\pm	0,000005
Byk296172	>> 100**			0,001	\pm	0,0001
rLDTI	>> 10**			0,0002	\pm	0,00002
Aprotinin	>> 5000**			>> 5000**		

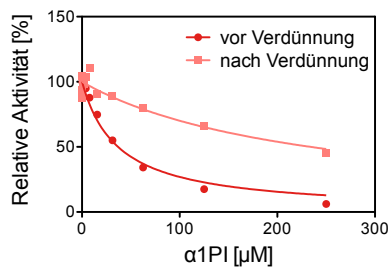
5.5.8.3 Interaktion der rhTryptase γ mit Serpinen

Aufgrund der tetrameren Struktur und der in Richtung der zentralen Pore ausgerichteten aktiven Zentren wird Tryptase β im Gegensatz zu nahezu allen anderen Serinproteasen nicht durch im Blut zirkulierende Inhibitoren wie die Serpine α 1PI, ATIII sowie α ₂-Macroglobulin gehemmt. Zur Untersuchung der Inhibition der rhTryptase γ durch Serpine wurde rhTryptase γ (0,2 μ M) mit steigenden Konzentrationen des α 1PI sowie ATIII (je 0 - 250 μ M) über 24 h bei 37°C inkubiert; als Kontrolle diente Trypsin (0,02 μ M) mit α 1PI (0 - 0,2 μ M). Um die Bindung des Inhibitors – reversibel oder irreversibel – an rhTryptase γ zu analysieren, wurde die enzymatische Restaktivität mit den Substraten Z-FR-AMC bzw. bz-R-AMC (10 bzw. 20 μ M) direkt bzw. nach 1:10 Verdünnung bestimmt (Abb. 5.5-21). Die Restaktivität der rhTryptase γ wird durch steigende Konzentrationen des α 1PI nahezu vollständig gehemmt; diese Hemmung ist über 24 h stabil. Nach 1:10 Verdünnung der Ansätze ist eine geringere prozentuale Hemmung zu beobachten, die ebenfalls über die Zeit konstant ist. Dies bedeutet, dass die Verdünnung zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den Reaktanten führt, die Hemmung der rhTryptase γ durch α 1PI also reversibel ist. Dagegen wird Trypsin in einem stöchiometrischen Verhältnis von α 1PI vollständig gehemmt; nach der Verdünnung der Ansätze ändert sich die prozentuale Hemmung nicht, wie bei der irreversiblen Bindung des α 1PI an Trypsin zu erwarten ist.

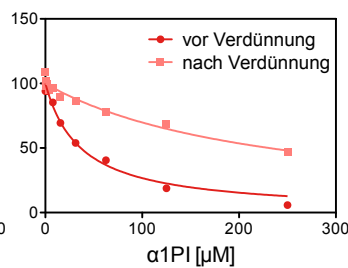
Die Messung der enzymatischen Restaktivität der rhTryptase γ nach Inkubation mit ATIII zeigt (Abb. 5.5-22), dass steigende Konzentrationen des Serpins wiederum zur vollständigen Hemmung der enzymatischen Aktivität der rhTryptase γ führen und dass die prozentuale Inhibition über die Zeit ansteigt. Die Verdünnung der Ansätze führt nach einstündiger Inkubation der rhTryptase γ mit ATIII zu einer Abnahme der prozentualen Hemmung, während nach längerer Inkubation über 24 h die Hemmung konstant bleibt. Diese Ergebnisse zeigen, dass ATIII initial reversibel mit rhTryptase γ interagiert und der Komplex in einer langsamen Reaktion zu einer irreversiblen Hemmung führt. Die Inaktivierung von Proteasen durch Serpine beruht klassischer Weise auf einer irreversiblen, kovalenten Bindung des Inhibitors an die Protease und resultiert in einem SDS- und hitzestabilen Komplex. Um die Bindung der Serpine α 1PI und ATIII an rhTryptase γ zu untersuchen, wurde die Komplexbildung im Vergleich zu Trypsin bzw. Faktor Xa mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Dazu wurden die Proteasen (je 5 μ M) mit dem Serpin (10 μ M) über 24 h bei 37°C inkubiert; für die Inkubation mit ATIII wurde dem Puffer 50 μ g/ml Heparin zugefügt. Die Inkubation der rhTryptase γ mit α 1PI zeigt über die Zeit gleichbleibende Banden mit Molekularmassen von ca. 33 kDa und 52 kDa, d. h. keine Hinweise auf eine irreversible Komplexbildung (Abb. 5.5-23). Im Vergleich dazu führt die Inkubation des Trypsins mit α 1PI schon nach kurzer Zeit (0 h) zum Auftreten zwei zusätzlicher Banden

$\alpha 1\text{PI} + \text{rhTryptase } \gamma$

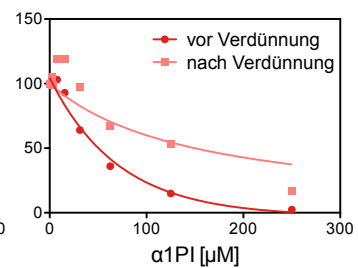
Präinkubation 1 h



4 h

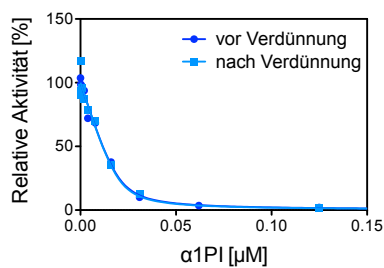


24 h

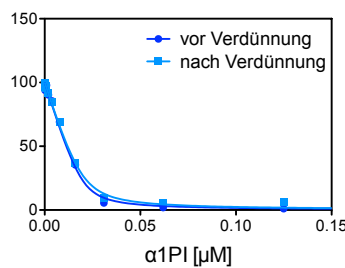


$\alpha 1\text{PI} + \text{Trypsin}$

Präinkubation 1 h



4 h



24 h

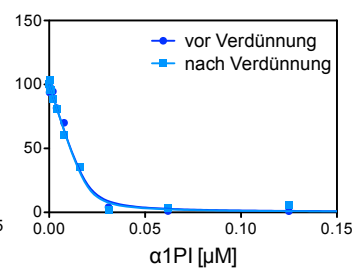
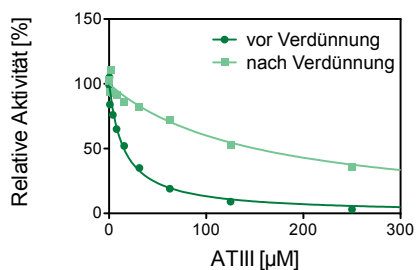


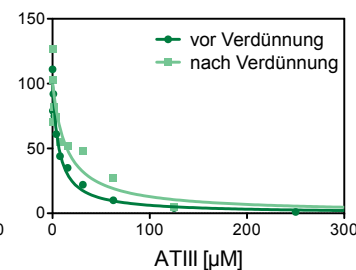
Abb. 5.5-21: Inhibitorische Wirkung des $\alpha 1\text{PI}$ auf $\text{rhTryptase } \gamma$ und Trypsin. Die $\text{rhTryptase } \gamma$ ($0,2 \mu\text{M}$) und Trypsin ($0,02 \mu\text{M}$) wurden mit steigenden Konzentrationen $\alpha 1\text{PI}$ ($0 - 250 \mu\text{M}$ bzw. $0 - 0,25 \mu\text{M}$) über 24 h bei 37°C inkubiert. Vor und nach der Verdünnung ($1:10$) der Proben wurden die Restaktivitäten mit den Substraten Z-FR-AMC ($10 \mu\text{M}$) bzw. bz-R-AMC ($20 \mu\text{M}$) bestimmt. Auf der Abszisse ist jeweils die Ausgangskonzentration der Proben angegeben.

$\text{ATIII} + \text{rhTryptase } \gamma$

Präinkubation 1 h



4 h



24 h

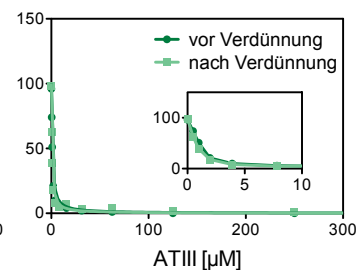


Abb. 5.5-22: Hemmung von $\text{rhTryptase } \gamma$ durch ATIII. Nach Inkubation der $\text{rhTryptase } \gamma$ ($0,2 \mu\text{M}$) mit steigenden Konzentrationen ATIII ($0 - 250 \mu\text{M}$) über 24 h bei 37°C wurde die enzymatische Aktivität mit dem Substrat Z-FR-AMC ($10 \mu\text{M}$) vor und nach Verdünnung ($1:10$) gemessen. Auf der Abszisse ist die Ausgangskonzentration der Proben angegeben. Nach 24 h sind die Graphen auch in einer kleineren Skalierung bis $10 \mu\text{M}$ ATIII dargestellt.

mit Molekularmassen ≥ 83 kDa, die einem SDS-stabilen Komplex entsprechen, der allerdings über die Zeit instabil ist.

Nach Inkubation der rhTryptase γ mit ATIII ist im SDS-PAGE nach einer Stunde neben den Banden der Proteine mit molekularen Massen von 33 kDa bzw. 58 kDa eine zusätzliche Bande von ca. 91 kDa zu beobachten (Abb. 5.5-24). Die Intensität dieser Bande nimmt über 24 h zu, während die Intensitäten der Banden der rhTryptase γ sowie des ATIII stetig abnehmen. Auch die Reaktion des Faktor Xa mit ATIII führt schon nach kurzer Zeit zur Bildung zwei zusätzlicher Banden mit Molekülmassen von ca. 83 kDa und 93 kDa, deren Intensität über 24 h zunimmt, während die des Faktor Xa abnimmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass rhTryptase γ mit ATIII einen SDS-stabilen, kovalenten Komplex bildet, jedoch in einer sehr langsamen Reaktion.

Zusammenfassend wird die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ im Gegensatz zu der der Tryptase β , durch die Interaktion mit Serpinen gehemmt. Die Analyse des Inhibitionsmechanismus zeigt jedoch, dass rhTryptase γ im Gegensatz zu Trypsin und anderen Serinproteasen durch α 1PI reversibel gehemmt wird und mit dem Inhibitor keinen kovalenten Komplex ausbildet. Dagegen führt die Interaktion des ATIII mit rhTryptase γ initial zu einer reversiblen Bindung, die in der Folge zu einer langsamen irreversiblen Hemmung führt.

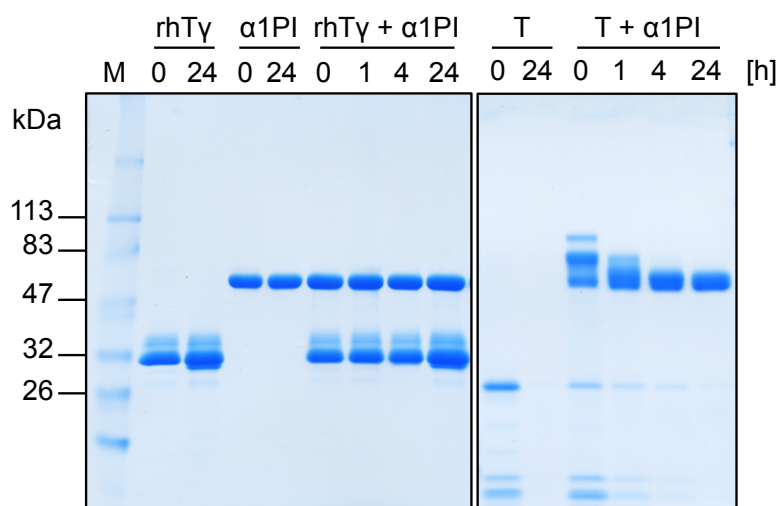


Abb. 5.5-23: Analyse der Komplexbildung des Serpins α 1PI mit rhTryptase γ und Trypsin. Nach Inkubation des α 1PI (10 μ M) mit rhTryptase γ (rhTy) und Trypsin (T) (je 5 μ M) über 24 h bei 37°C wurde die Komplexbildung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung untersucht. Das α 1PI zeigt mit rhTryptase γ keine zusätzliche Bande und somit keine kovalente Komplexbildung. Dagegen treten mit Trypsin schon nach kurzer Zeit zwei Banden mit größerer Molekülmasse auf, die über die Zeit nicht stabil sind.

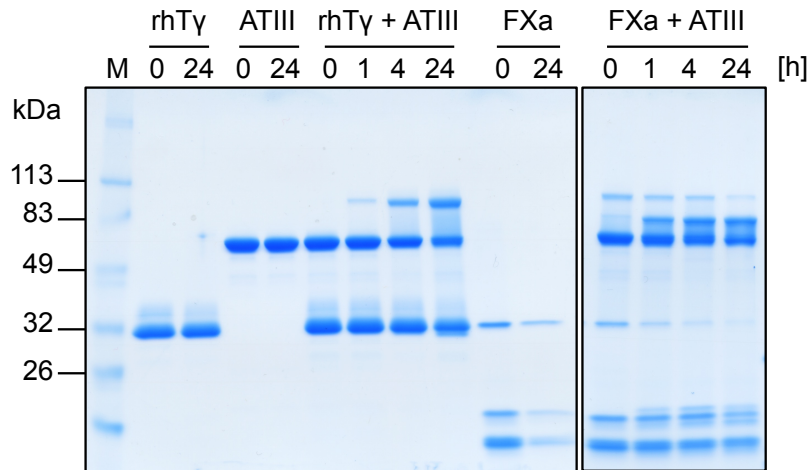


Abb. 5.5-24: Komplexbildung des ATIII mit rhTryptase γ und Faktor Xa. Nach Inkubation des ATIII ($10 \mu\text{M}$) mit rhTryptase γ (rhTy) bzw. Faktor Xa (FXa; je $5 \mu\text{M}$) über 24 h bei 37°C wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und Coomassie-Färbung analysiert. Beide Proteasen gehen eine kovalente Komplexbildung mit ATIII ein, die anhand einer zusätzlichen Bande mit einer Molekularmasse von ca. 100 kDa zu erkennen ist.

5.5.8.4 Inhibition der rhTryptase γ durch Serum

Um die Inhibition der enzymatischen Aktivität der rhTryptase γ durch Serum im Vergleich zur Tryptase β und Trypsin zu untersuchen, wurden die Proteasen (je $1 \mu\text{M}$) mit Serum (95 %) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1:10, 1:30 sowie 1:100 verdünnt und die enzymatische Restaktivität mit den Substraten Z-FR-AMC, Boc-LKR-AMC bzw. Z-LR-AMC (je $10 \mu\text{M}$) gemessen (Abb. 5.5-25). Die rhTryptase γ zeigt bei geringer Verdünnung von 1:10 eine Restaktivität von $< 25 \%$, die durch größere Verdünnung auf bis zu $> 75 \%$ steigt. Trypsin weist dagegen unabhängig von der Verdünnung eine Restaktivität von $< 25 \%$ auf. Tryptase β zeigt unabhängig von der Verdünnung eine residuale Aktivität von ca. 75% . Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass rhTryptase γ in einem kurzen Zeitraum von 30 min durch Serumproteine reversibel gehemmt wird. Dagegen wird die Aktivität von Trypsin unter den gleichen Bedingungen irreversibel inhibiert und die Aktivität der Tryptase β kaum beeinflusst.

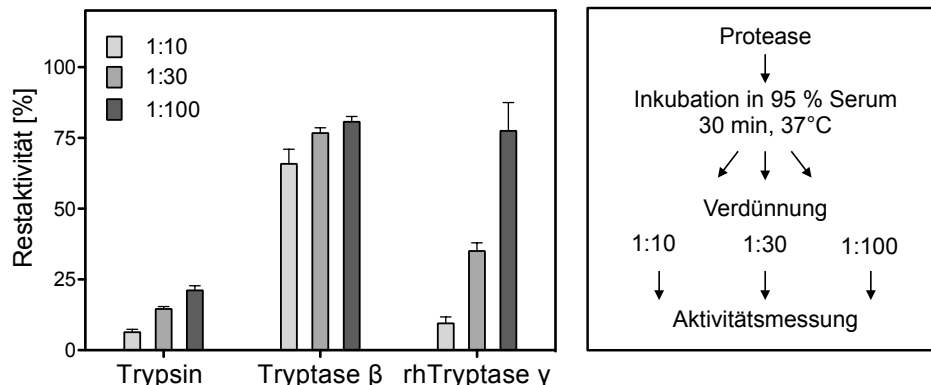


Abb. 5.5-25: Einfluss von Serum auf die enzymatische Aktivität der Tryptasen und Trypsin. Die Proteasen ($1 \mu\text{M}$) wurden 30 min bei 37°C in Serum (95 %) inkubiert, die Proben 1:10, 1:30 oder 1:100 verdünnt und die enzymatische Aktivität mit den Substraten Z-FR-AMC, Boc-LKR-AMC bzw. Z-LR-AMC (je $10 \mu\text{M}$) bestimmt. Die Restaktivität wurde bezogen auf die entsprechende unbehandelte Probe berechnet. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$.

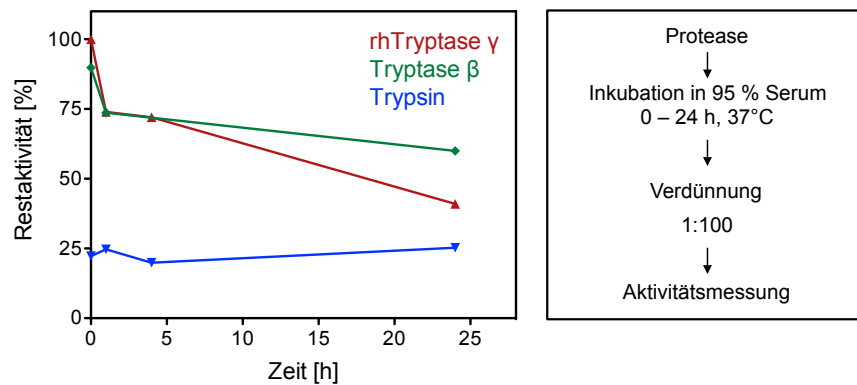


Abb. 5.5-26: Einfluss von Serum auf die enzymatische Aktivität der Tryptasen und Trypsin. Die Proteasen (1 μ M) wurden über 24 h bei 37°C in 95 %-igen Serum inkubiert, die Proben wurden 1:100 verdünnt und die enzymatische Restaktivität bestimmt.

Um die inhibitorische Wirkung des Serums auf die rhTryptase γ über die Zeit zu bestimmen, wurden die Proteasen über 24 h in Serum (95 %) bei 37°C inkubiert, die Proben 1:100 verdünnt und die enzymatische Restaktivität bestimmt (Abb. 5.5-26). Die rhTryptase γ zeigt dabei einen Verlust der Restaktivität auf < 50 %, während die residuale Aktivität der Tryptase β und Trypsin weitgehend stabil sind. Dies zeigt eine langsame irreversible Hemmung der rhTryptase γ im Serum, die den Beobachtungen einer etwa 50 %-igen Hemmung nach 24 h Inkubation der rhTryptase γ mit ATIII entspricht (s. Abb. 5.5-24).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass rhTryptase γ im Gegensatz zu Tryptase β mit Serpinen interagiert, jedoch nur in einer sehr langsamen Reaktion durch ATIII irreversibel inaktiviert wird. Die Inkubation mit Serum zeigte, dass rhTryptase γ entsprechend den Ergebnissen mit den Serpinen durch Serumproteine gehemmt wird. Sowohl die Inkubation mit ATIII als auch mit Serum führt innerhalb von 24 h zu einer etwa 50 %-igen Hemmung der rhTryptase γ . Dies zeigt, dass die Inhibition der rhTryptase γ durch Serum weitgehend auf der Interaktion mit ATIII beruht und dass die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ über einen längeren Zeitraum im Serum stabil ist.

5.6 Herstellung spezifischer rhTryptase γ -Substrate

5.6.1 Analyse der Substratspezifität mit *Hybrid Combinatorial Substrate Libraries*

Bei der Synthese von Peptidsubstraten zur Detektion und Quantifizierung von Proteasen können neben natürlichen auch nicht natürlich vorkommende Aminosäuren verwendet werden, um die Sensitivität und Selektivität zu erhöhen. Zur Bestimmung der Präferenz gegenüber Aminosäurederivaten an den Positionen P2-P4 wurden drei *Hybrid Combinatorial Substrate Libraries* (HyCoSuL; M. Drag, Universität Wrocław) verwendet. Dazu wurde die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ und β (1 bzw. 0,5 nM) mit den jeweiligen Substratbibliotheken (je 5 μ M) bei physiologischem pH über 30 min bei 37°C gemessen und die Ergebnisse auf die höchste Aktivität normalisiert.

Die Analyse der erweiterten Substratspezifität mit natürlichen Aminosäureresten (*Position Scanning Libraries*, s. a. 5.5.6.2) zeigte, dass rhTryptase γ an P2 fast ausschließlich große aromatische Aminosäurereste akzeptiert. Die HyCoSuL-Analyse bestätigt diese Präferenz und zeigt, dass rhTryptase γ an P2 v. a. Tyrosin- (Tyr(2,6Cl₂-Z), Tyr(2-Br-Z)) und Phenylalaninderivate (Phe(4-Me), Phe(4-Br)) sowie Alaninderivate mit aromatischen Gruppen toleriert (Ala(2th), Bta, hCha, 1-Nal); die Derivate Tyr(Bzl) sowie Phe(NH₂) werden im Vergleich zu den natürlichen Substituenten um den Faktor 9 bzw. 3 bevorzugt (Abb. 5.6-1). Dagegen favorisiert Tryptase β Substrate mit polaren und amphipathischen Seitenketten an P2 (Hyp, Dab(Z), Lys(2-ClZ), hSer(Bzl)) und akzeptiert Phenylalaninderivate nicht, was den Beobachtungen mit natürlichen Aminosäureresten entspricht. Beide Tryptasen spalten keine Substrate mit D-Aminosäureresten an P2.

Beide Tryptasen akzeptieren an P3 nicht nur natürliche basische Aminosäurereste, sondern auch deren Derivate (Dap, Dab, Orn, Lys(2-Cl-Z), Arg(Z)₂, hArg) (Abb. 5.6-2). Daneben werden eine Vielzahl von anderen Resten akzeptiert, wobei die Präferenzen der beiden Tryptasen korrelieren. Auffallend ist, dass Tryptase β viele D-Aminosäurereste toleriert, rhTryptase γ dagegen nur D-Trp akzeptiert. Unter den natürlichen Aminosäuren ist Glu der einzige Substituent, der von rhTryptase γ aber nicht Tryptase β akzeptiert wird; diese Diskriminierung wird durch die Derivate nicht verbessert.

Auch an P4 bestätigt und erweitert die HyCoSuL-Analyse die Ergebnisse mit den natürlichen Aminosäureresten (Abb. 5.6-3). Beide Tryptasen akzeptieren nicht nur Pro, sondern auch andere aliphatische Aminosäurereste. An dieser Position akzeptiert Tryptase β sehr viel mehr Reste, insbesondere mit aromatischen Substituenten (Idc, Ala(Bth), Cys(Bzl), 2-Nal). Die rhTryptase γ akzeptiert dagegen nur einige wenige Reste v. a. mit verzweigten und zyklischen Seitenketten (Oic, dhLeu, Phg, Chg).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass sich die Präferenzen der Tryptasen γ und β gegenüber Aminosäurederivate an Position P2 maßgeblich unterscheiden, während die Spezifität an P3 und P4 ähnlicher sind und teilweise überlappen. Für die Entwicklung spezifischer Substrate für rhTryptase γ konnten nicht-natürliche Aminosäurereste identifiziert werden, die an P2 besser akzeptiert werden als natürliche Aminosäuren und somit zu einer erhöhten Sensitivität beitragen können. An den Positionen P3 und P4 wurden vor allem Substituenten identifiziert, die von rhTryptase γ toleriert, jedoch nicht von Tryptase β akzeptiert werden und daher zur Selektivität beitragen können.

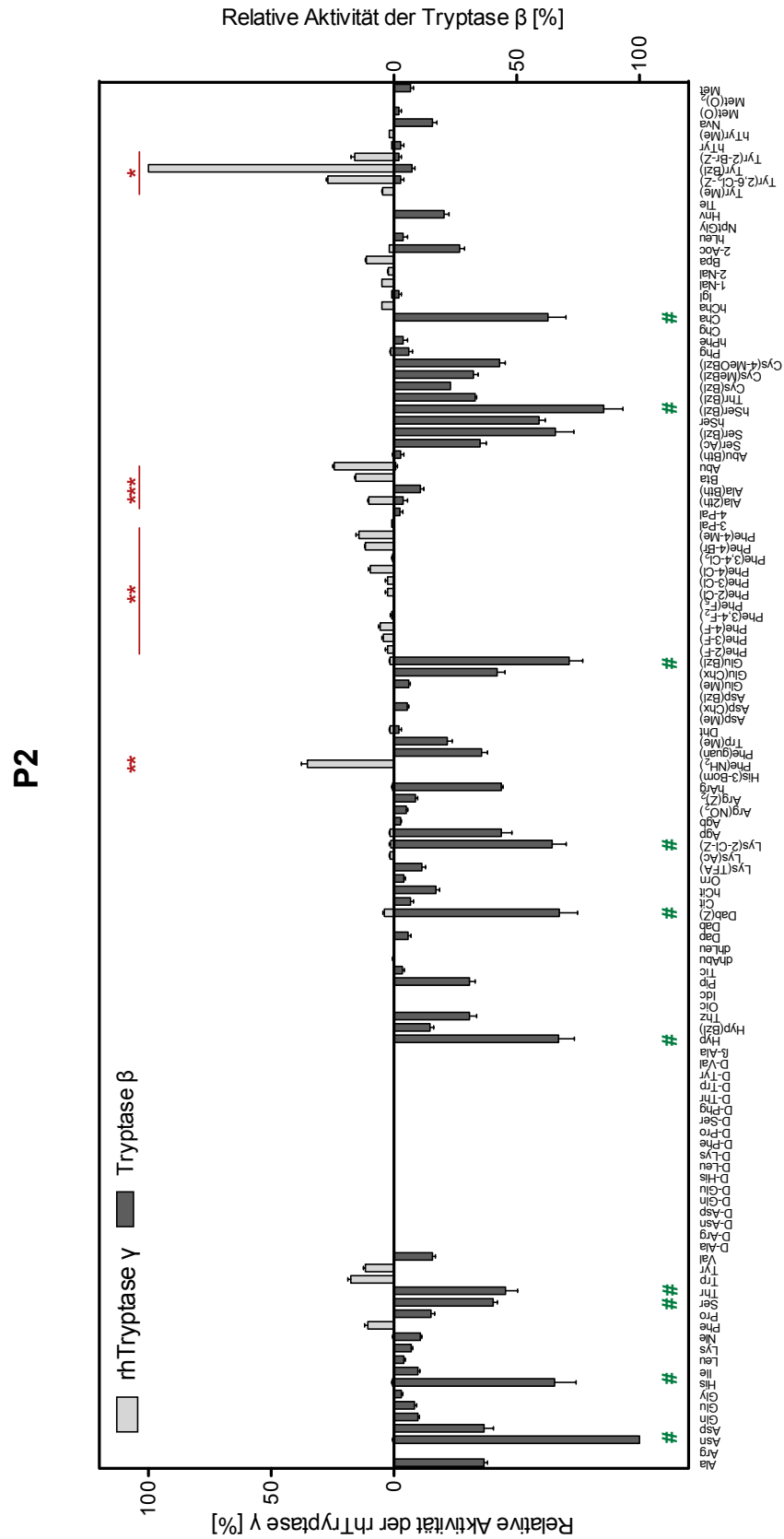


Abb. 5.6-1: Präferenzen der Tryptasen gegenüber natürlichen und nicht-natürlichen Aminosäureresten an P2. Die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ (1 nM) und Tryptase β (0,5 nM) wurde mit der P2-Bibliothek (5 μ M) über 30 min bei 37°C gemessen. Mittelwerte \pm SEM, n=3. * Tyrosin-; ** Phenylalanin-; *** Alaninderivate; # favorisierte Aminosäurereste von Tryptase β .

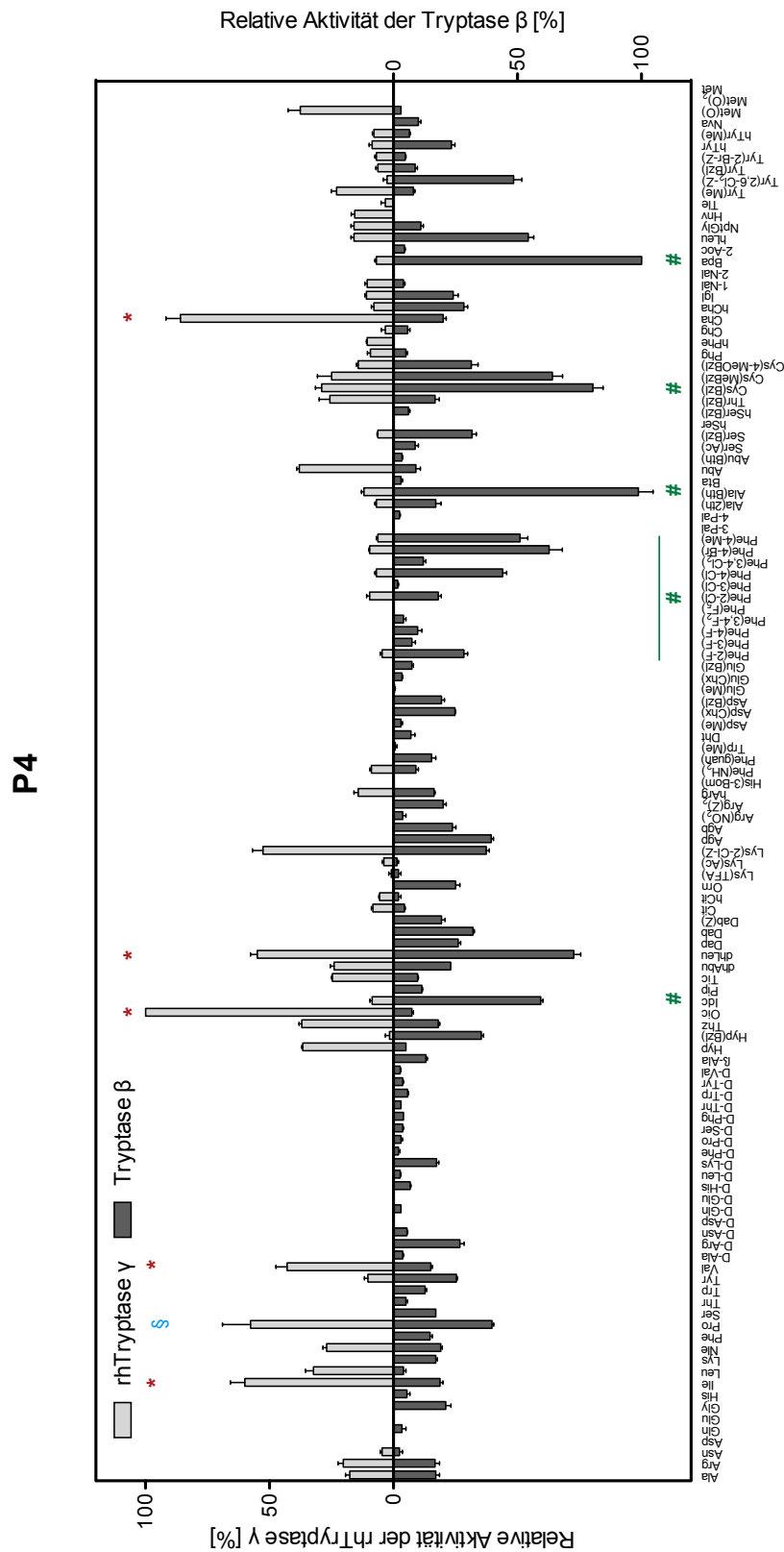


Abb. 5.6-3: Substratspezifität der Tryptasen gegenüber den Aminosäuren an P4. Die enzymatische Aktivität wurde wie in Abb. 41 beschrieben, gemessen ($n=3$; Mittelwerte \pm SEM). * von rhTryptase γ favorisierte Aminosäurereste; § Pro; # von Tryptase β favorisierte Aminosäurereste;

5.6.2 Synthese und Charakterisierung von rhTryptase γ -Substraten

Um selektive Substrate für rhTryptase γ zu synthetisieren, wurden basierend auf den Ergebnissen der HyCoSuL (s. 5.6.1) Aminosäurederivate für die Positionen P2 - P4 ausgewählt, die von rhTryptase γ bevorzugt und von Tryptase β , Trypsin und Thrombin jedoch nicht akzeptiert werden (Tab. 5.6-1).

Tab. 5.6-1: Auswahl von Aminosäureresten zur Synthese spezifischer Substrate für Tryptase γ .

P4	P3	P2	P1
L-Phg	L-Glu	L-Phe(NH ₂)	L-Arg
L-Hnv		L-Trp	
L-Chg		L-Phe(4-Me)	

Zur Charakterisierung der synthetisierten Substrate (M. Drag, Universität Wrocław) wurden die Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Umsatzrate (k_{cat}) und katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) bestimmt. Dazu wurde rhTryptase γ mit einer Verdünnungsreihe der Substrate (0 - 50 μ M) bei 37°C inkubiert, die enzymatische Aktivität gemessen und die kinetischen Kenngrößen über die Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt; wenn nötig wurde die Enzymkonzentration an die Messbedingungen adaptiert (Abb. 5.6-4).

Die Bestimmung der katalytischen Effizienz zeigt, dass rhTryptase γ die Substrate Ac-Phg-Glu-Phe(NH₂)-Arg-ACC und Ac-Chg-Glu-Phe(NH₂)-Arg-ACC um den Faktor 4 bzw. 12 besser hydrolysiert als das bisher verwendete Substrat Z-Phe-Arg-AMC (Tab. 5.6-2). Die erhöhte katalytische Effizienz ergibt sich aus einer höheren Affinität (um den Faktor 5 niedrigere K_m) bei ähnlicher bzw. leicht gesteigerter Umsatzrate. An Position P4 wird Chg über Phg bevorzugt, an P2 Phe(NH₂), der Austausch durch Phe(4Me) oder Trp führt jeweils zu einer Reduktion der katalytischen Effizienz um den Faktor 7 bzw. 4.

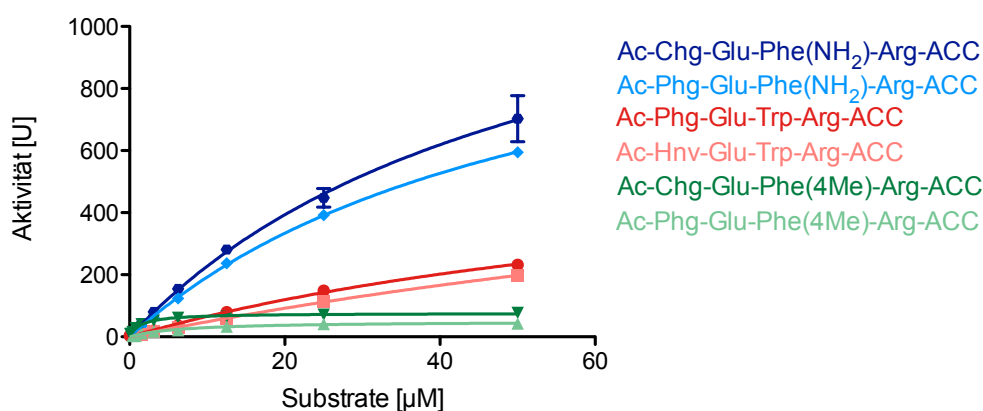


Abb. 5.6-4: Michaelis-Menten-Kinetik von rhTryptase γ -Substraten. Die enzymatische Aktivität der rhTryptase γ (5 - 200 nM) wurde bei steigenden Konzentrationen der Substrate (0 - 50 μ M) über 10 min bei 37°C bestimmt und die Kenngrößen anschließend über die Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt. Mittelwerte \pm SD, n=3.

Tab. 5.6-2: Kinetische Kenngrößen der untersuchten rhTryptase γ -Substrate. Mittelwerte \pm SD, $n=3$.

Substrat	k_{cat} [s ⁻¹]	K_m [μ M]	k_{cat}/K_m [s ⁻¹ M ⁻¹]
Ac-Chg-Glu-Phe(NH ₂)-Arg-ACC	0,35 \pm 0,07	60 \pm 14	6200 \pm 640
Ac-Phg-Glu-Phe(NH ₂)-Arg-ACC	0,12 \pm 0,002	55 \pm 5	2150 \pm 180
Ac-Chg-Glu-Phe(4Me)-Arg-ACC	0,001 \pm 0,0002	2,5 \pm 0,1	410 \pm 4
c-Phg-Glu-Phe(4Me)-Arg-ACC	0,02 \pm 0,006	55 \pm 8	320 \pm 65
Ac-Hnv-Glu-Trp-Arg-ACC	0,06 \pm 0,001	110 \pm 8	500 \pm 35
Ac-Phg-Glu-Trp-Arg-ACC	0,07 \pm 0,002	100 \pm 5	630 \pm 20
Z-Phe-Arg-AMC	0,15 \pm 0,03	310 \pm 70	510 \pm 65
tos-Gly-Pro-Arg-AMC	0,01	200	40

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Synthese fluorogener Substrate basierend auf HyCoSuL durchaus zu sensitiveren Substraten führen kann. Alle Substrate haben eine höhere Affinität (niedrigere K_m) zu rhTryptase γ als das bisherige Substrat Z-Phe-Arg-AMC, jedoch wird nur ein Substrat mit höherer Rate umgesetzt. Um die Umsetzungsrate zu steigern, sollen jetzt Substrate mit Tyr(Bzl) an P2 synthetisiert werden, das in der HyCoSuL von rhTryptase γ favorisiert wurde (s. Abb. 5.6-1). Darüber hinaus soll Glu an P3 durch andere Substituenten wie Ser und Thr ersetzt werden.

Um die Selektivität der Substrate für rhTryptase γ zu untersuchen, wurden die kinetischen Kenngrößen auch mit den Serinproteasen Tryptase β , Trypsin und Thrombin bestimmt (Tab. 5.6-3). Aufgrund der limitierten Löslichkeit konnte bei Trypsin und Thrombin keine Substratsättigung erzielt werden, daher wurde hier lediglich das Verhältnis k_{cat}/K_m bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass alle neu synthetisierten Substrate von rhTryptase γ im Vergleich zu anderen Proteasen mit höherer katalytischer Effizienz gespalten werden (Faktor 1,3 - 820). Insbesondere die von rhTryptase γ favorisierten Substrate (mit P2 = Phe(NH₂), P4 = Chg, Phg) werden von rhTryptase γ mit höherer Effizienz gespalten als durch die verwandten Proteasen (Faktor 14 - 310). Im Gegensatz dazu wurde das bisher verwendete Substrat Z-Phe-Arg-AMC von Trypsin sowie Thrombin mit deutlich höheren katalytischen Effizienzen (Faktor 62 bzw. 8) gespalten. Damit ist es gelungen Substrate zu entwickeln, die eine Selektivität für rhTryptase γ gegenüber verwandten Proteasen aufweisen. Der Vergleich der katalytischen Effizienzen zeigt jedoch, dass die rhTryptase γ favorisierten Substrate deutlich schlechter umgesetzt werden als die von anderen Proteasen bevorzugten Substrate.

Insgesamt konnten durch die Synthese neuer Substrate für rhTryptase γ zwei Substrate identifiziert werden, die im Vergleich zu dem bisher verwendeten Substrat deutlich an Selektivität und Sensitivität gewonnen haben. Jedoch sind die Sensitivitäten für die Detektion geringer Konzentrationen an rhTryptase γ noch nicht optimal. Daher sollen weitere Substrate mit anderen Substituenten v. a. an P2 und P3 synthetisiert und untersucht werden.

Tab. 5.6-3: Katalytische Effizienzen der rhTrypsasen γ und β , Trypsin und Thrombin gegenüber den Substraten. Die enzymatische Aktivität der Proteasen wurde gegenüber steigenden Konzentrationen der Substrate (0 - 50 μ M) gemessen. Die katalytischen Effizienzen der Trypsase β wurden über die Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt. Die k_{cat}/K_m -Werte von Trypsin und Thrombin wurden über die Steigung ($V/[S]$) bestimmt. Mittelwerte \pm SD, $n = 3$.

Substrat	rhTrypsase γ	k_{cat}/K_m [$s^{-1}M^{-1}$]		
		Trypsase β	Trypsin	Thrombin
Ac-Chg-Glu-Phe(NH ₂)-Arg-ACC	6200	75 \pm 5	180 \pm 2	20 \pm 1
Ac-Phg-Glu-Phe(NH ₂)-Arg-ACC	2150	20 \pm 2	150 \pm 30	7 \pm 2
Ac-Chg-Glu-Phe(4Me)-Arg-ACC	410	0,5 \pm 0,05	25 \pm 2	2 \pm 1
Ac-Phg-Glu-Phe(4Me)-Arg-ACC	320	2 \pm 1	50 \pm 1	4 \pm 0,5
Ac-Hnv-Glu-Trp-Arg-ACC	500	35 \pm 4	390 \pm 100	3 \pm 1
Ac-Phg-Glu-Trp-Arg-ACC	630	25 \pm 3	330 \pm 70	3 \pm 1
Z-Phe-Arg-AMC	510	310 \pm 50	32.000 \pm 1.600	4.300 \pm 490
tos-Gly-Pro-Arg-AMC	40	0,4*10 ⁶ \pm 0,4*10 ⁵	13*10 ⁶ \pm 3*10 ⁶	25*10 ⁶ \pm 1*10 ⁶

5.7 Herstellung spezifischer anti-rhTryptase γ Antikörper

5.7.1 Charakterisierung von anti-Tryptase-Antikörpern

Antikörper-basierte Methoden wie Immunblot, (Sandwich-)ELISA und Immunhistologie haben gegenüber Substrat-basierten Methoden den Vorteil, dass sie nicht nur enzymatisch aktive Proteasen, sondern auch inaktive Formen wie z. B. Zymogene und Inhibitor-Protease-Komplexe detektieren. Antikörper spielen deshalb insbesondere auch zur Detektion der Tryptase-Familie eine wesentliche Rolle, da zwei der vier Tryptasen, d. h. α und δ , (weitgehend) enzymatisch inaktiv sind.

Nach der rekombinanten Herstellung der Tryptasen α , β , γ und δ war es erstmals möglich die Spezifität kommerzieller und in unserer Arbeitsgruppe generierter Antikörper gegenüber allen relevanten Tryptasen mit Hilfe indirekter ELISAs zu untersuchen. Dazu wurden 96-well-Maxi-Sorb-Platten mit den rekombinanten Tryptasen (5 $\mu\text{g/ml}$; 100 μl) über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden ungebundene Proteasen durch Waschen mit PBS von der Platte gewaschen und der zu untersuchende Primärantikörper (Verdünnungen 1:10² - 10⁵) zugegeben. Nach Inkubation (1 h, 37°C) wurden ungebundene Antikörper von der Platte gewaschen, ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper zugegeben (s. Tab. 4.2-6) und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit dem Peroxidasesubstrat TMB 30 min bei 37°C inkubiert und das Produkt durch Absorptionsmessung bei 450 nm detektiert (Abb. 5.7-1).

Alle untersuchten Antikörper detektieren eine oder mehrere der rekombinanten Tryptasen. Andererseits detektiert keiner der untersuchten Antikörper die archetypische Serinprotease Trypsin, die eine 40 %-ige Sequenzidentität zu Tryptase β aufweist. Keiner der Tryptase-Antikörper differenziert zwischen den Tryptasen α und β , was die hohe Sequenzidentität reflektiert. Mehrere Antikörper binden monospezifisch die Tryptasen α/β , γ oder δ . So binden die monoklonalen Antikörper AA1 und H9 monospezifisch die Tryptasen α/β , der monoklonale Antikörper MAB1667 sowie der polyklonale AF1667 die Tryptase γ sowie das Zymogen und der polyklonale TPSD1 Tryptase δ . Die polyklonalen Antikörper sTE1 und KII binden die eng verwandten Tryptasen α , β und δ nicht aber Tryptase γ , was wiederum der Sequenzidentität entspricht. Interessanterweise detektiert der monoklonale Antikörper MAB1222/G3 die Tryptasen α , β , γ und etwa um den Faktor 100 weniger das Tryptase γ -Zymogen. Er erkennt jedoch nicht Tryptase δ , obwohl die Sequenzidentität von Tryptase γ zu α/β deutlich kleiner ist als die von Tryptase δ . Dieser Antikörper wurde in mehreren Studien zur Untersuchung der biologischen Funktion von Tryptase α/β verwendet; aufgrund der jetzt identifizierten Kreuzreaktivität zur rhTryptase γ sind diese Ergebnisse nicht eindeutig.

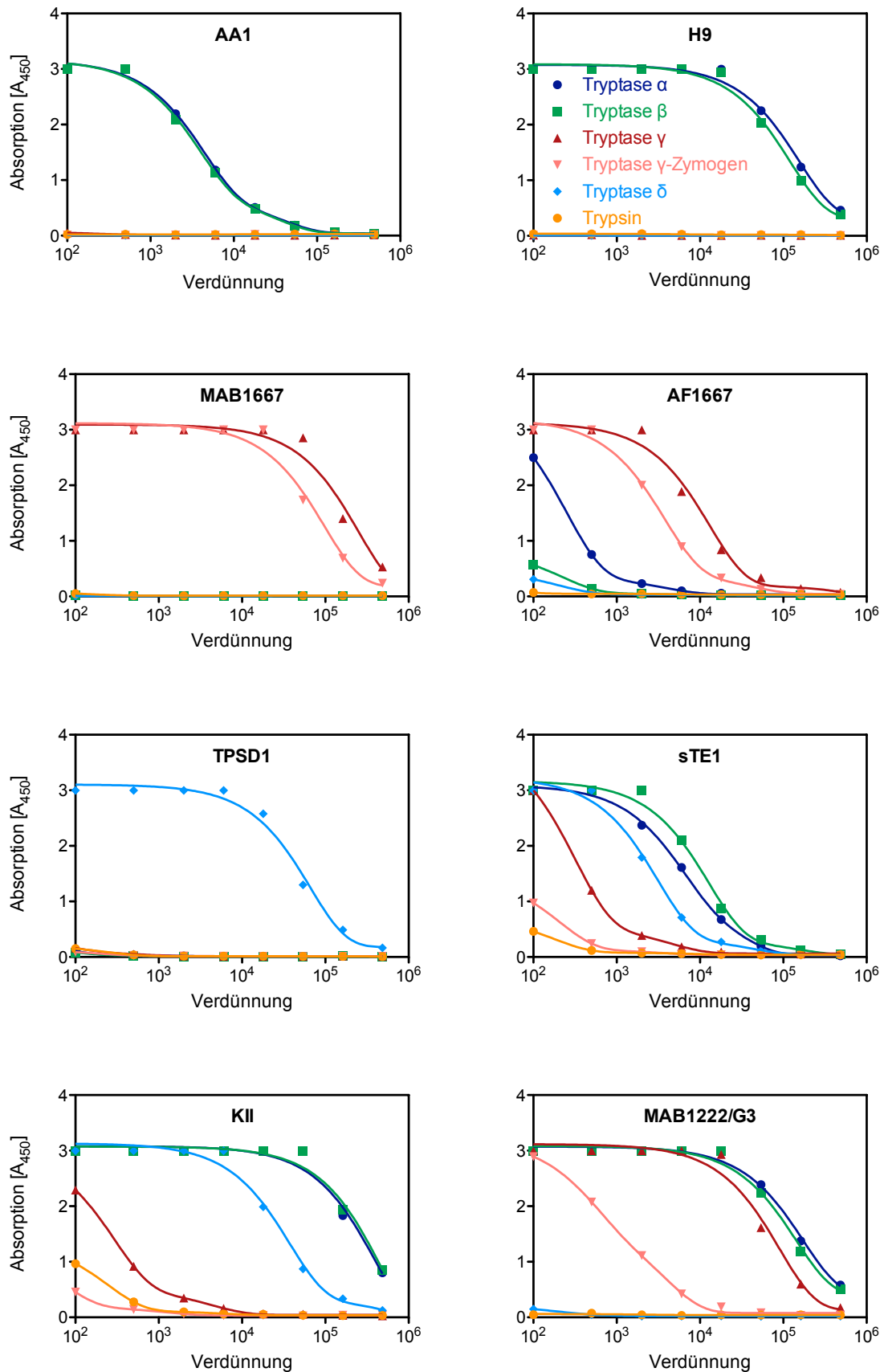


Abb. 5.7-1: Charakterisierung der Spezifität von anti-Tryptase-Antikörpern mittels indirektem ELISA. 96-well-MaxiSorb-Platten wurden über Nacht mit den verschiedenen Tryptasen (je 5 $\mu\text{g/ml}$; 100 μl) beschichtet. Nach Inkubation mit den Primärantikörpern (Verdünnungen $1:10^2$ - 10^5) wurden diese durch entsprechende HRP-konjugierte Sekundärantikörper und dem Substrat TMB detektiert.

5.7.2 Herstellung eines polyklonalen anti-Tryptase γ -Antikörpers

5.7.2.1 Immunisierung von Kaninchen mit rhTryptase γ

Um einen polyklonalen, spezifisch gegen Tryptase γ gerichteten Antikörper herzustellen, wurden zwei Kaninchen mit rhTryptase γ immunisiert (Firma Biogenes, Berlin; s. a. 4.2.7.1). Die gewonnenen Seren wurden anschließend hinsichtlich der Reaktion mit den Tryptasen γ und β mittels indirekten ELISA (s. a. 5.7.1) analysiert (Abb. 5.7-2). Im Gegensatz zu den jeweiligen Präimmunseren erkennen die Seren beider Kaninchen nach der Immunisierung beide Tryptasen. Die Titer, d.h. die Verdünnung mit halbmaximaler Reaktion, sind mit $8,9 \cdot 10^4$ für rhTryptase γ bzw. $3,6 \cdot 10^4$ für Tryptase β sehr ähnlich, ein in Hinblick auf die Sequenzidentität von ca. 50 % nicht erwartetes Ergebnis. Die Seren erscheinen damit hinsichtlich ihrer hohen Titer bzw. Affinität gegenüber den Tryptasen für die Entwicklung Antikörperbasierter Assays wie ELISA geeignet, jedoch nicht hinsichtlich ihrer Spezifität.

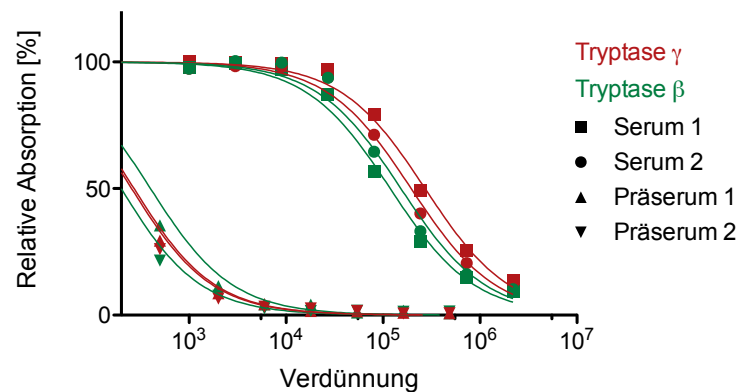


Abb. 5.7-2: Charakterisierung von Seren vor und nach Immunisierung mit rhTryptase γ mittels indirektem ELISA. Während die Präimmunseren der Kaninchen keine der Tryptasen binden, zeigen die Seren nach Immunisierung ähnliche Titer gegenüber den Tryptasen γ und β .

5.7.2.2 Kopplung der Tryptasen an AminoLink Plus Coupling Resin

Zur Isolierung der rhTryptase γ - bzw. Tryptase β -Antikörper aus den Kaninchenseren wurden Affinitätsmatrize hergestellt, indem die Tryptasen γ und β an *AminoLink Plus Coupling Resin* immobilisiert wurden. Dazu wurden die Tryptasen (je 5 mg in ca. 3 ml) gegen einen Kopplungspuffer (pH 7,2) über Nacht dialysiert und das Säulenmaterial (2 ml) in einer offenen Säule (5 ml; 0,85 x 0,75 cm, h x r) mit dem gleichen Puffer äquilibriert. Die Tryptasen wurden in Anwesenheit von Cyanoborhydrid (50 mM) über primäre Amine an die Aldehyd-aktivierte Agarose gekoppelt (4°C, ÜN). Anschließend wurden die ungebundenen Proteine zur Bestimmung der Kopplungseffizienz abgetrennt, das Säulenmaterial mit dem Kopplungspuffer (3 CV) gewaschen und noch freie Amine durch Zugabe von Tris (1 M; pH 7,4) in Anwesenheit von Cyanoborhydrid blockiert. Schließlich wurde das Säulenmaterial mit NaCl (1 M; 5 CV) gewaschen, die Säule mit Lagerungspuffer (PBS, 0,01 % Azid; 3 CV) äquilibriert und bei 4°C aufbewahrt. Abschließend wurde die enzymatische Aktivität (Abb. 5.7-3) der Tryptasen und der Proteingehalt vor und nach der Kopplung bestimmt; es konnten jeweils > 98 % der Tryptasen an das Säulenmaterial gebunden werden.

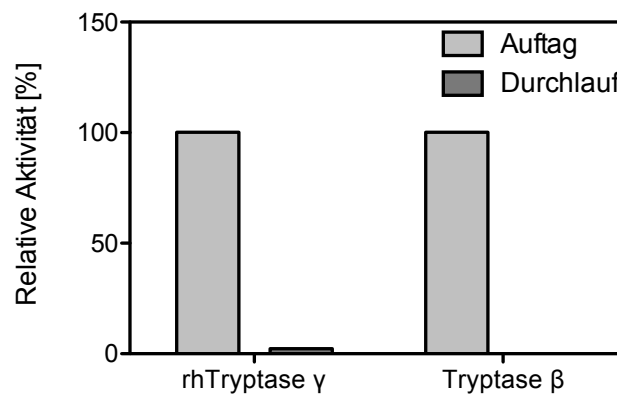


Abb. 5.7-3: Bestimmung der Kopplungseffizienz mittels Aktivitätsmessung. Die enzymatische Aktivität der Tryptasen wurde in der Auftrags- und Durchlaufraction bestimmt.

5.7.2.3 Isolierung anti-rhTryptase γ-Antikörper mittels zweistufiger Affinitätschromatographie

Ausgehend von den polyklonalen Antiseren wurden spezifische, gegen rhTryptase γ gerichtete Antikörper mittels kombinierter positiver und negativer Affinitätschromatographie an immobilisierte rhTryptase γ bzw. β aufgereinigt. Dazu wurde Serum (7,5 ml) 3:1 mit PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C *end-over-end* (1 ml/min) auf eine rhTryptase γ-Säule (2 ml; 1,5 x 0,65 cm, h x r) aufgetragen. Die ungebundenen Proteine wurden mit PBS von der Säule gewaschen und anschließend spezifisch gebundene Proteine durch pH-Änderung auf pH 3 von der Säule eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden durch Zugabe von Tris-Puffer (pH 9) neutralisiert und die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen vereinigt (9 ml). Diese wurden gegen PBS dialysiert und auf eine Tryptase β-Säule (2 ml; 1,5 x 0,65 cm, h x r) analog zur rhTryptase γ-Säule aufgetragen (4°C, ÜN). Die ungebundenen Antikörper wurden in der Durchlaufraction aufgefangen (8,5 ml).

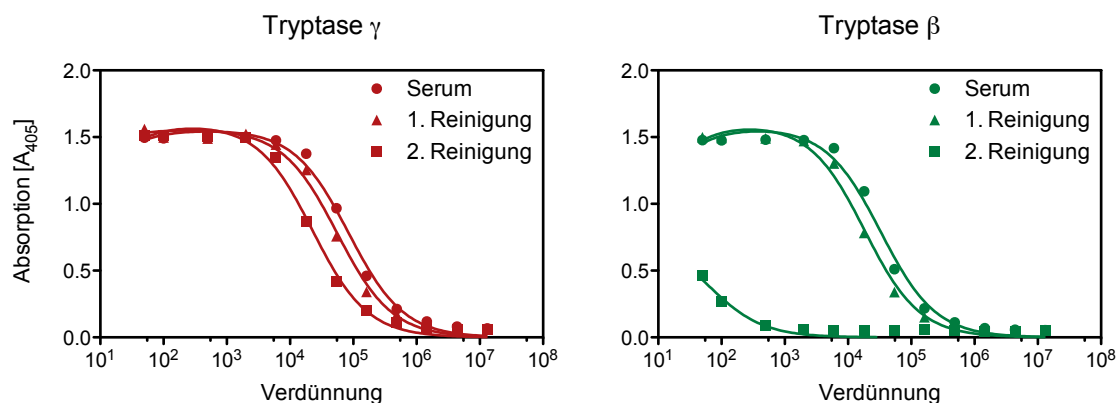


Abb. 5.7-4: Isolierung von anti-rhTryptase γ-Antikörpern aus Kaninchenserum mittels positiver und negativer Affinitätschromatographie. Die Antikörper wurden durch pH-Änderung von der Säule gelöst und mittels indirekten ELISA auf ihre Affinität hin untersucht.

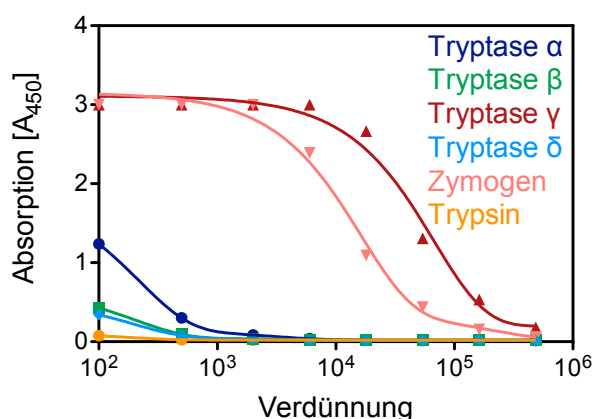


Abb. 5.7-5: Charakterisierung des Kaninchen anti-Tryptase γ Antikörpers gegenüber den vier Tryptasen und Trypsin. Die aufgereinigten Antikörper erkennen spezifisch rhTryptase γ und das Tryptase γ -Zymogen.

Die Charakterisierung des aufgereinigten Antikörpers im Vergleich zum Serum und der ersten Reinigung mittels indirekten ELISA (Abb. 5.7-4) zeigt, dass sich der anti-rhTryptase γ -Titer nur wenig ändert ($9 \cdot 10^4$ auf $3 \cdot 10^4$). Dagegen ist der anti-Tryptase β -Titer durch die Reinigung von $6 \cdot 10^4$ im Serum auf 40 stark reduziert worden. Daraus ergibt sich, dass der affinitätsgereinigte Antikörper, der im Folgenden TGIV genannt wird, die rhTryptase γ bindet aber keine signifikante Kreuzreaktivität mehr zu Tryptase β aufweist.

Darüber hinaus wurde die Spezifität der isolierten Antikörper gegenüber den Tryptasen und Trypsin mittels indirekten ELISA untersucht (Abb. 5.7-5). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass der polyklonale anti-rhTryptase γ -Antikörper nur die rhTryptase γ und das Tryptase γ -Zymogen mit ähnlich hohen Titern bzw. Affinität detektiert, während er die verwandten Proteine nicht erkennt.

Die Bilanzierung (Tab. 5.7-1) der Antikörperisolierung zeigt, dass im ersten Schritt ca. 2 mg Antikörper ausgehend von 10 ml Serum bzw. 260 mg Protein isoliert wurden. Etwa die Hälfte (0,8 mg) der Antikörper sind spezifisch gegenüber rhTryptase γ .

Tab. 5.7-1: Bilanzierung der Aufreinigung des anti-Tryptase γ -Antikörpers aus Kaninchenserum. Der Proteingehalt der Proben wurde über die Absorptionsmessung bei 280 nm, die Ausbeuten über die Titerbestimmung ermittelt.

	Volumen [ml]	Absorption [A ₂₈₀]	Protein [mg/ml]	Protein _{ges} [mg]	Titer rhTryptase γ [IC ₅₀]	Titer Tryptase β [IC ₅₀]
Serum	10	35,8	26,3	263	$8,9 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$
1. Reinigung	9	0,3	0,2	1,9	$5,7 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$
2. Reinigung	8,5	0,1	0,1	0,8	$2,5 \cdot 10^4$	35

5.8 Entwicklung eines Sandwich-ELISA für rhTryptase γ

5.8.1 Auswahl der ELISA-Antikörper

Um geeignete Antikörper für die Entwicklung eines Sandwich-ELISAs für rhTryptase γ auszuwählen, wurde zunächst die Bindung der verfügbaren rhTryptase γ -spezifischen polyklonalen (TGIV und AF1667) und monoklonalen (MAB1667 und MAB1222/G3) Antikörper verglichen. Dazu wurde eine MaxiSorb-Platte mit steigenden Konzentrationen rhTryptase γ (0 - 2 $\mu\text{g/ml}$; 100 μl) beschichtet. Nach Inkubation mit den vier Antikörpern (je 1:250 Verdünnung; 1 h, 37°C) wurde deren Bindung mit einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (je 1:5000; s. Tab. 4.2-6) quantifiziert (Abb. 5.8-1). Während die polyklonalen Antikörper TGIV und AF1667 die rhTryptase γ in Konzentrationen zwischen 0,03 und 0,06 $\mu\text{g/ml}$ sensitiv detektieren, binden die monoklonalen Antikörper sie erst bei deutlich höheren Konzentrationen (> 0,3 $\mu\text{g/ml}$). Daher wurden die polyklonalen Antikörper zur Entwicklung eines Sandwich-ELISAs verwendet.

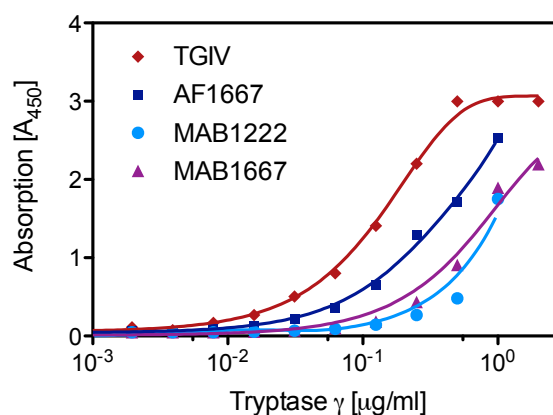


Abb. 5.8-1: Vergleich der Bindung der Antikörper gegenüber rhTryptase γ mittels indirekten ELISA. Die rhTryptase γ wird von den polyklonalen Antikörpern TGIV und AF1667 um den Faktor 10 sensitiver detektiert als durch die monoklonalen Antikörper.

5.8.2 Optimierung des rhTryptase γ -ELISAs

Im nächsten Schritt wurde die Verwendung der beiden polyklonalen Antikörper als Beschichtungs- bzw. Detektionsantikörper im Sandwich-ELISA untersucht. Dazu wurde eine Maxi-Sorb-Platte mit dem Antikörper TGIV oder AF1667 in verschiedenen Verdünnungen (1:250, 1:500, 1:1000) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach Inkubation mit rhTryptase γ (5 $\mu\text{g/ml}$; 1 h, 37°C) wurde der jeweils andere Antikörper zur Detektion eingesetzt (1:250, 1:500, 1:1000; 1 h, 37°C) und dessen Bindung mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Antikörper (je 1:5000; 1 h, 37°C) nach Substratzugabe quantifiziert (Tab. 5.8-1). Die Ergebnisse zeigen, dass prinzipiell beide Antikörper in beiden Positionen des Sandwich-ELISAs verwendet werden können. Für die weitere Entwicklung des Sandwich-ELISAs wurde AF1667 als Beschichtungs- und TGIV als Detektionsantikörper gewählt, da durch diese Reihenfolge eine etwas höhere Sensitivität zu erwarten ist.

Tab. 5.8-1: Auswahl des Beschichtungs- und Detektionsantikörpers im Sandwich-ELISA. Die Absorptionswerte A_{450} sind durch Verwendung des AF1667 als Beschichtungs- und des TGIV als Detektionsantikörper etwas höher.

Absorption [A ₄₅₀]		Detektion TGIV			Detektion AF1667			
Beschichtung AF1667	1:250	1:500	1:1000	Beschichtung TGIV	1:250	1:500	1:1000	
1:250	3	3	2,9	1:250	3	2,8	2,1	
1:500	3	3	2,6	1:500	3	2,7	2,0	
1:1000	3	2,8	2,2	1:1000	3	2,3	1,7	

Um die Konzentration der Beschichtungs- und Detektionsantikörper im Sandwich-ELISA zu optimieren, wurde zunächst der Beschichtungsantikörper AF1667 in verschiedenen Verdünnungen (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000) eingesetzt und der Detektionsantikörper TGIV (1:250) sowie der anti-Kaninchen-HRP-Antikörper (1:5000) konstant gehalten (Abb. 5.8-2). Die Detektion einer rhTryptase γ -Standardreihe (0 - 1 $\mu\text{g/ml}$) zeigt, dass bei niedrigen Verdünnungen des Beschichtungsantikörpers (d. h. 1:250 und 1:500) die Sensitivität des ELISAs höher ist. Anschließend wurde der Beschichtungsantikörper in den niedrigen Verdünnungen (1:250, 1:500) und der Detektionsantikörper mit 1:250, 1:500 und 1:1000 eingesetzt (Abb. 5.8-3). Die Daten zeigen, dass die höchste Sensitivität bei Verwendung einer 1:250-Verdünnung beider Antikörper erreicht wird. Somit wurden im Folgenden beide Antikörper mit einer 1:250-Verdünnung eingesetzt.

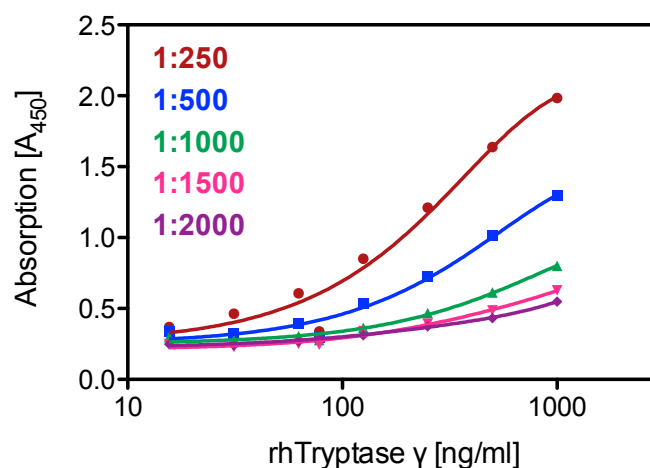


Abb. 5.8-2: Sensitivität des Beschichtungsantikörpers im Sandwich-ELISA. Nachdem der AF1667-Antikörper in verschiedenen Verdünnungen auf die Maxi-Sorb-Platte beschichtet wurde, wurde eine abfallende Konzentrationsreihe der rhTryptase γ (max. Endkonz. 1 $\mu\text{g/ml}$) mit dem TGIV-Antikörper (1:250) detektiert.

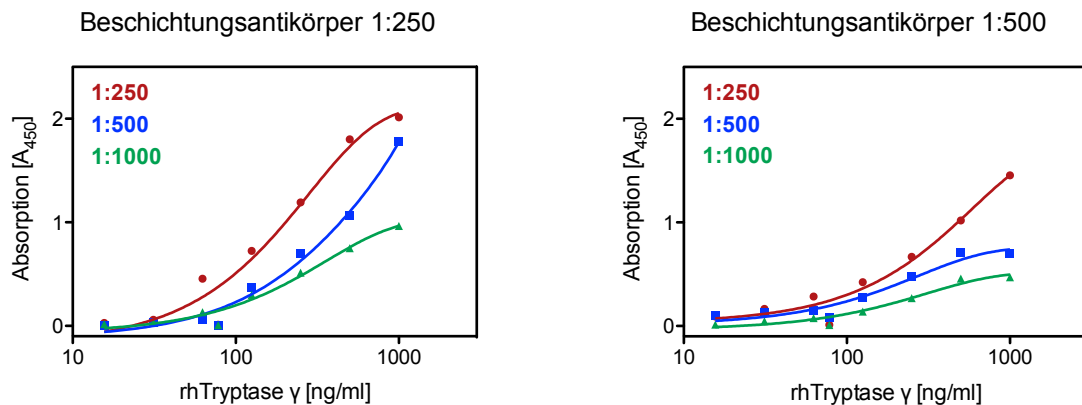


Abb. 5.8-3: Verdünnungen des Detektionsantikörpers. Nach Beschichtung mit dem Antikörper AF1667 (1:250 und 1:500) wurde mit rhTryptase γ (0 - 1 $\mu\text{g/ml}$) und dem Detektionsantikörper in drei Verdünnungen (1:250, 1:500, 1:1000) inkubiert. Die Sensitivität der Detektion mittels Sandwich-ELISA ist bei der Kombination beider Antikörper in einer 1:250 Verdünnung am höchsten.

5.8.3 Validierung des Sandwich-ELISAs zur Quantifizierung von Tryptase γ

Nach Optimierung des Tryptase γ -Sandwich-ELISAs wurde der Assay hinsichtlich der Kriterien Kalibrierbereich, Präzision, Sensitivität, Selektivität und Wiederfindung basierend auf den Richtlinien des AOAC (Association of Official Analytical Chemists), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) und ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) validiert [116-121]. Zur Bestimmung des Kalibrierbereichs wurde rhTryptase γ über acht Stufen seriell verdünnt (max. Konzentration 200 ng/ml) und an sieben verschiedenen Tagen

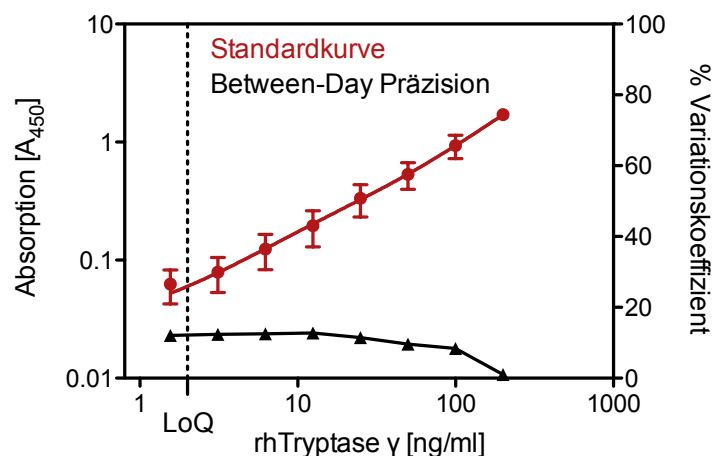


Abb. 5.8-4: Standardkurve und Bestimmung der Between-Day Präzision. Die rhTryptase γ wurde über acht Stufen seriell verdünnt (0 - 200 ng/ml) und an sieben Tagen durch zwei Anwender mittels Sandwich-ELISA gemessen. Die Mittelwerte \pm SD der Absorption sind gegen die rhTryptase γ -Konzentration aufgetragen und in einem log-log-Diagramm dargestellt. Die Wiederholbarkeit der Kalibrierung an verschiedenen Tagen (Between-Day Präzision) wurde durch den Variationskoeffizient bestimmt, der aus dem Verhältnis des Mittelwerts zur SD ermittelt wurde. Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist durch den Leerwert + 10 \times SD des Leerwerts der Standardkurve definiert, daraus ergibt sich die minimale Konzentration an rhTryptase γ , die präzise bestimmt werden kann.

durch zwei Anwender mittels Sandwich-ELISA gemessen (Abb. 5.8-4). Die Mittelwerte \pm SD sind in einem log-log-Diagramm dargestellt und zeigen einen linearen Messbereich zwischen 1,5 und 200 ng/ml. Der Variationskoeffizient der Messwerte zwischen verschiedenen Tagen beträgt im Mittel 10 %. Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) gibt die Konzentration an, ab der ein Analyt präzise bestimmt werden kann und ist definiert durch den Leerwert + 10x Standardabweichung des Leerwerts. Aus den Mittelwerten der Leerwerte der Kalibrierungskurve ergibt sich ein LoQ von 2 ng/ml rhTryptase γ . Zusammenfassend weisen die Ergebnisse einen weiten Messbereich (> 100 -fach) des Sandwich-ELISAs auf, in dem rhTryptase γ mit einer Sensitivität bis zu 2 ng/ml mit einer *Between-Day Repeatability* Präzision von 10 % bestimmt werden kann.

Um die Selektivität des Assays zu validieren wurde die Detektion der verwandten Proteine Tryptasen α , β und δ sowie Trypsin untersucht. Dazu wurden diese über 8 Stufen seriell verdünnt (0 - 10 μ g/ml) und im Vergleich zur reifen Form und zum Zymogen der Tryptase γ (0 - 0,2 μ g/ml) im Sandwich-ELISA an drei verschiedenen Tagen gemessen (Abb. 5.8-5). Dabei zeigt sich, dass ausschließlich die rhTryptase γ und das Tryptase γ -Zymogen nachgewiesen werden, während selbst in 50-fach höheren Konzentrationen weder die verwandten Tryptasen α , β oder δ noch Trypsin detektiert werden. Auffällig ist, dass das Tryptase γ -Zymogen etwas höhere Signale liefert, sodass die Quantifizierungsgrenze bei 1,2 ng/ml liegt. Dies kann durch die geringere Faltung des Zymogens (s. a. 5.3.4.1) und mehr freiliegenden Epitopen bedingt sein.

Die Wiederfindungsrate ist definiert als das Verhältnis des Messergebnisses eines Analyten und der tatsächlichen Menge des Analyten, die vor der Messung der Probe zugefügt wurde und sollte zwischen 80 und 120 % liegen. Bias ist der Unterschied zwischen Ergebnis und

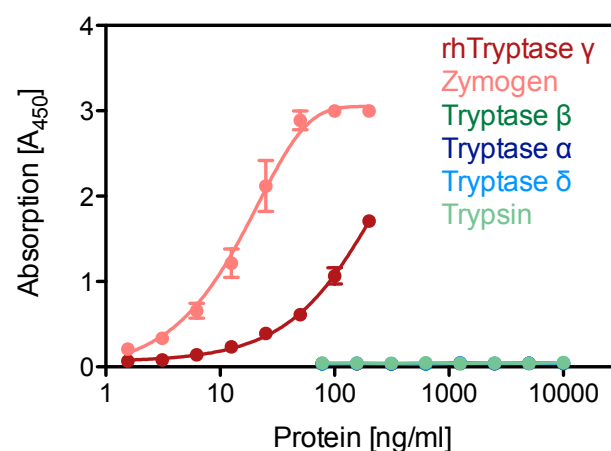


Abb. 5.8-5: Selektivität des Sandwich-ELISAs für rhTryptase γ . Der Sandwich-ELISA wurde mit steigenden Konzentrationen des Zymogens und der rhTryptase γ (0 - 0,2 μ g/ml) sowie der Tryptasen α , β , δ und Trypsin (0 - 10 μ g/ml) durchgeführt. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. Der Sandwich-ELISA ist spezifisch für Tryptase γ und detektiert nicht die anderen Tryptasen oder Trypsin. Das Zymogen der Tryptase γ wird mit höherer Sensitivität detektiert als die reife Form.

Referenzwert. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde rhTryptase γ (25 und 100 ng/ml) zu humanen Serum, das zuvor unterschiedlich verdünnt wurde (1:5, 1:10, 1:50), zugegeben und als Probe an drei verschiedenen Tagen mit Hilfe des Sandwich-ELISAs gemessen (Abb. 5.8-6). Insgesamt liegen die Wiederfindungsraten zwischen 78 % und 103 % und der Bias sinkt mit steigendem Verdünnungsfaktor des Serums von 21 % auf 3 %. Zusammenfassend ergeben die Untersuchungen, dass der Sandwich-ELISA prinzipiell für die Detektion von rhTryptase γ in Serum geeignet ist und die Messergebnisse ab einer Serumverdünnung von 1:10 präzise werden.

Insgesamt zeigt die Validierung, dass der etablierte Sandwich-ELISA rhTryptase γ und das Zymogen über einen weiten Messbereich und adäquater Präzision selektiv detektiert. Die Sensitivität ist mit 2 ng/ml akzeptabel und entspricht der des diagnostisch genutzten Tryptase α/β -ELISAs mit einer LoQ von 1 ng/ml; ein noch niedriger Wert wäre wünschenswert. Die Wiederfindungsraten der rhTryptase γ im Serum liegen bei einer 10-fachen Serumverdünnung im optimalen Bereich, sodass eine Anwendung des Assays zur Quantifizierung in humanen Serumproben möglich erscheint.

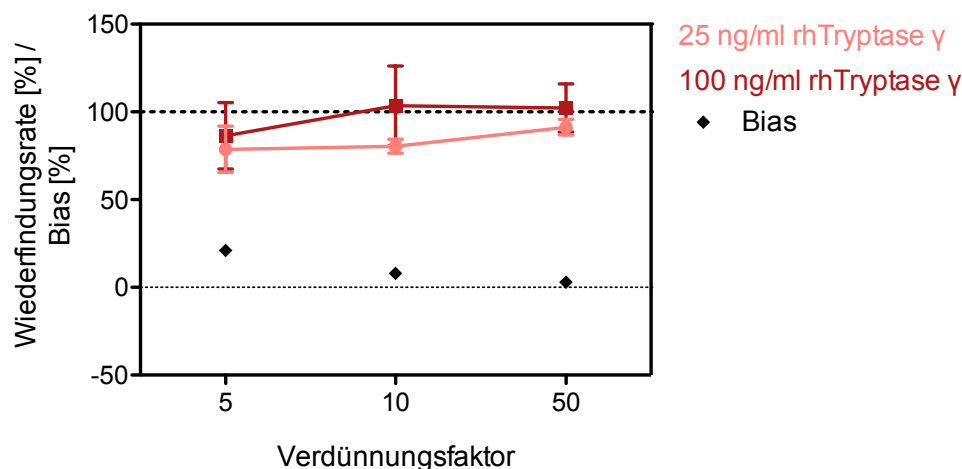


Abb. 5.8-6: Wiederfindung der rhTryptase γ in Serum. Nach Verdünnung des Serums um den Faktor 5, 10 und 50 wurde es mit 25 und 100 ng/ml rhTryptase γ versetzt und als Probe mit dem Sandwich-ELISA gemessen. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. Die Wiederfindungsrate ergibt sich aus dem Verhältnis des Messergebnisses und der eingesetzten Menge des Analyten und ist optimal zwischen 80 und 120 %. Der Bias gibt den Unterschied zwischen Ergebnis und Referenzwert an und wurde basierend auf allen Messergebnissen einer Serumverdünnung ermittelt. Beide Konzentrationen der rhTryptase γ werden ab einer Serumverdünnung von 1:10 mit einem Bias < 10 % im Serum wieder gefunden.

6 Diskussion

Mastzellen sind zentrale Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, aber sind auch an der Auslösung pathophysiologischer Prozesse wie chronischen Entzündungen und Allergien beteiligt [1, 6, 11-14]. Nach Aktivierung wird ihre Wirkung durch die Freisetzung neu synthetisierter und in Granula gespeicherter Mediatoren vermittelt [6, 21]. Zu den wichtigsten Mediatoren der Mastzelle wird die Tryptase-Familie gerechnet, eine Gruppe von vier verwandten Serinproteasen, den Tryptasen α , β , γ und δ [7]. Die Tryptasen α und β sind strukturell und funktionell sehr gut charakterisiert, sie werden als Biomarker für die Mastzellzahl und -aktivierung (z. B. im Rahmen einer Anaphylaxie-Diagnose) klinisch eingesetzt und sind Zielstrukturen der pharmazeutischen Entwicklung [22]. Über die Bedeutung der beiden Tryptasen γ und δ ist dagegen wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Tryptase γ in ausreichenden Mengen rekombinant hergestellt, um sie im Vergleich zur Tryptase β funktionell und strukturell zu charakterisieren.

6.1 Rekombinante Expression der katalytischen Domäne der Tryptase γ

6.1.1 Rekombinante Expression in *E. coli*

Zur biotechnologischen Herstellung der katalytischen Domäne der Tryptase γ wurde zunächst die Eignung von *E. coli* als Expressionssystem untersucht. Dabei wurden die Ausbeuten in verschiedenen Expressionsstämmen, mit verschiedenen Vektoren und der Einfluss eines Thioredoxin-Tags verglichen (Bachelorarbeit K. Suchowski, [122]). Auch unter optimierten Bedingungen führte die Expression vor allem zur Ausbildung von Einschlusskörperchen (bis zu 600 mg/l Kultur), lediglich ein Anteil von etwa 1 % konnte als lösliches Protein aus den Zellen gewonnen werden. Das rekombinante Fusionsprotein konnte mit korrektem N-Terminus aus den Einschlusskörperchen isoliert werden, die Rückfaltung zur Protease, die sich aktivieren lässt, gelang jedoch nicht [96, 122]. Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen mit anderen Tryptasen [35] sowie mit anderen Serinproteasen wie Trypsin [123] und Enterokinase [124]: Die Expression dieser Proteine führte ebenso zur Ausbildung von Einschlusskörperchen und die Proteasen konnten nur in geringen Ausbeuten gewonnen werden. Insgesamt lassen diese Erfahrungen nicht auf eine erfolgsversprechende Expression von Tryptase γ in *E. coli* schließen. Tryptasen besitzen Disulfidbrücken [25], die im reduzierenden Milieu des *E. coli*-Cytoplasmas nicht ausgebildet werden, sodass ungefaltete Proteine aggregieren [125]. Darüber hinaus hat Tryptase γ wie auch die Tryptasen α und β eine potenzielle Glykosylierungsstelle an Asn85 (s. Abb. 6.2-1) [25], die in *E. coli*

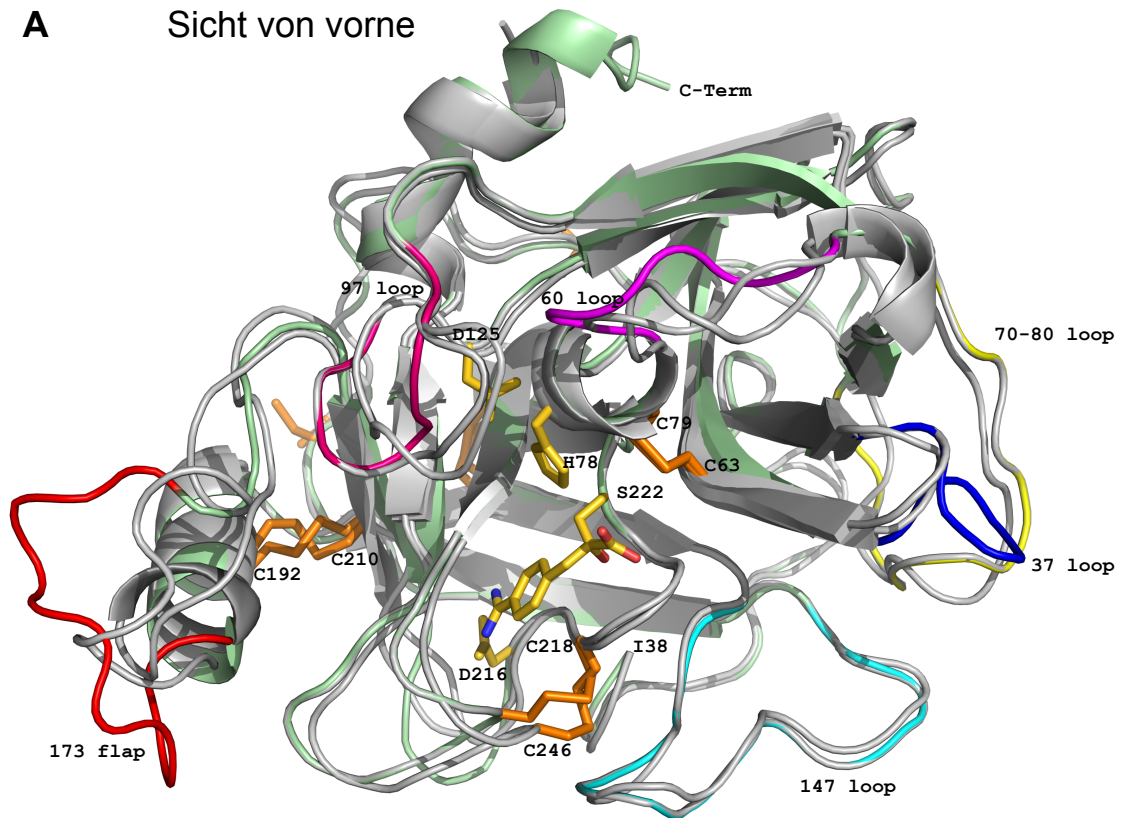
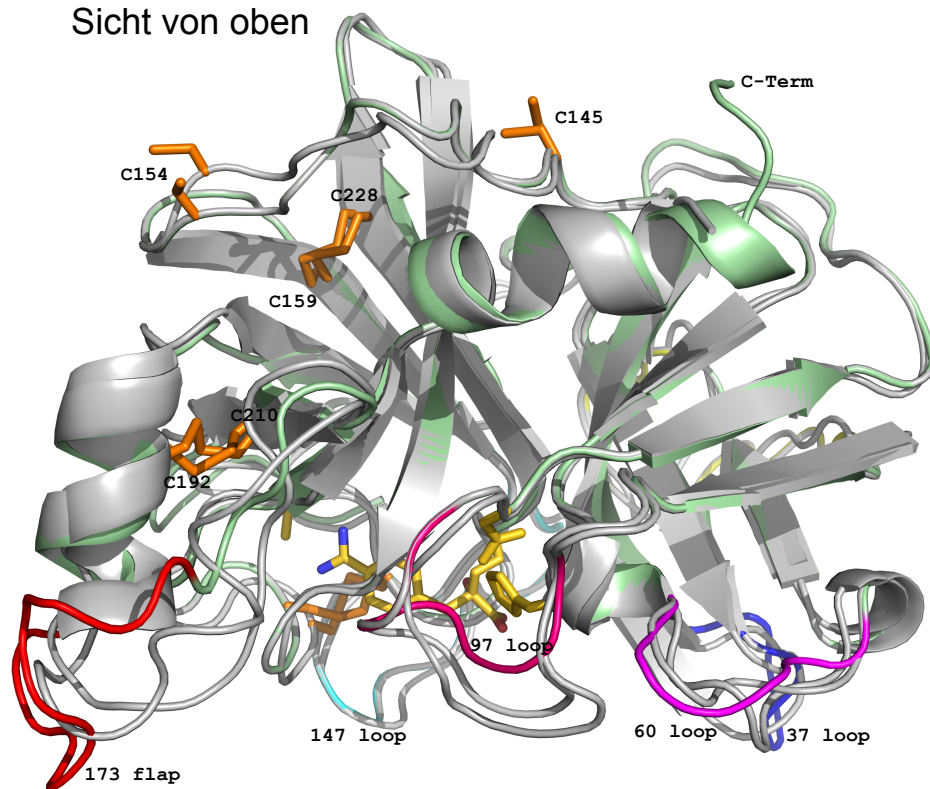
nicht posttranslational modifiziert wird [126]. Dementsprechend werden große Mengen der ungefalteten Tryptase γ in *E. coli* exprimiert, ohne dass eine korrekt gefaltete, enzymatisch aktive Protease gewonnen werden kann. Trotzdem konnte das Protein z. B. in immunologischen Assays als Mengenkontrolle eingesetzt werden.

6.1.2 Expression der wt-Form in *Pichia pastoris*

Als Alternative zur Expression in *E. coli* wurde die rekombinante Herstellung im eukaryotischen System der Hefe *P. pastoris* untersucht, die posttranslationale Modifikationen wie die Ausbildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung zulässt [123, 127, 128]. Dazu wurden Fusionskonstrukte verwendet [96], bei denen das Präpropeptid durch eine α -Faktor-signalsequenz ausgetauscht wurde, die die Sekretion in den Hefeüberstand vermittelt und während der Expression durch die Hefe-Protease KEX2 abgespalten wird. Zudem wurde die hydrophobe C-terminale Domäne durch einen c-myc-His₆-Tag ersetzt, um die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen und die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Die Expression der katalytischen Domäne der Tryptase γ führte jedoch im Gegensatz zum vergleichbaren Vorgehen bei den Tryptasen α und β [30, 35, 129, 130] lediglich zu geringen Mengen von etwa 10 $\mu\text{g/l}$, die für eine präparative Herstellung nicht ausreichend sind.

Im Vergleich zu anderen Tryptasen hat die Tryptase γ drei zusätzliche Cysteinreste in der Prodomäne (C26) und der katalytischen Domäne (C145 und C154). Zwei dieser Reste sollen potenziell eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden (C26-C145), die zu einer Zweikettenform in der reifen Form der Tryptase γ führen kann [25, 88]. Da die Zuordnung der Disulfidbrücken von Caughey *et al.* [25] und Wong *et al.* [88] widersprüchlich beschrieben worden sind, wurde ein Modell der katalytischen Domäne der wt-Tryptase γ generiert. Dabei wurden die Template-Strukturen der Tryptase β (PDB 1A0L) und Prostasin (PDB 3E0N) sowie die Programme Swiss-Model und PyMol verwendet (s. 4.2.8.2, Abb. 6.1-1). Die so erzeugten Modelle wurden anschließend mit der 3D-Struktur der Tryptase β verglichen.

Abb. 6.1-1: Überlagerung der Tryptase γ -Modelle mit der 3D-Struktur des Tryptase β -Monomers. Die Modelle der katalytischen Domäne der wt-Tryptase γ wurden mit Hilfe der Software Swiss-Model erstellt. Die Kristallstrukturen der Tryptase β (PDB 1A0L) und Prostasin (PDB 3E0N) dienten als Templates. Die Modelle sind mit der 3D-Struktur der Tryptase β -Monomers (hellgrün) überlagert. Die sechs Oberflächenloops der Tryptase β sind farblich markiert: 70-80 loop (gelb), 37 loop (blau), 147 loop (hellblau), 173 flap (rot), 97 loop (pink) und 60 loop (magenta). **A) Sicht von vorne.** Das Tryptase γ -Modell in Standardorientierung mit Blick auf das aktive Zentrum. Die Aminosäureseitenketten der katalytischen Triade S222, H78 und D125 (entsprechend der Chymotrypsin-Nummerierung S195, H57, D102) sind als gelbe Sticks dargestellt; ebenso die Seitenkette D216 (Chymotrypsin-Nr. D189), die am Boden der S1-Bindungstasche lokalisiert ist. Diese ordnen sich analog der Tryptase β -Struktur an und bilden eine offene S1-Bindungstasche aus. In der 3D-Struktur der Tryptase β ist das Inhibitionsmolekül APPA (gelbe Skelettstruktur) in der S1-Bindungstasche lokalisiert. Dort interagiert es mit der Seitenkette D216 und ist über die Carbonylgruppe kovalent an das S222 O- γ gebunden. Die Seitenketten der Cysteine und Disulfidbrücken sind orange eingefärbt. Die Disulfidbrücken C63-C79, C192-C210 und C218-246 sind im Tryptase γ -Modell zu denen der Tryptase β weitgehend homolog. Von den sechs Oberflächenloops des Tryptase γ -Modells unterscheiden sich die 173 flap und 37 loop in Länge und Konformation von denen der Tryptase β . Die 97 loop und 60 loop werden im Tryptase γ -Modell etwas anders ausgerichtet, die 70-80 loop sowie die 147 loop verlaufen weitgehend homolog zu denen der Tryptase β . **B) Sicht von oben.** Die vierte Disulfidbrücke C159-C228 ist im Tryptase γ -Modell konserviert. Die zusätzlichen Cysteinreste in der Polypeptidkette der Tryptase γ C145 und C154 liegen frei vor und sind an der Oberfläche exponiert.

A Sicht von vorne**B** Sicht von oben

Dabei zeigt sich, dass die Tryptase γ voraussichtlich vier Disulfidbrücken (C63-C79, C159-C228, C192-C210, C218-C246) ausbildet, die sich wie bei Tryptase β anordnen, was der Voraussage von Wong *et al.* [88] entspricht. Die zwei zusätzlichen Cysteinreste der katalytischen Domäne (C145 und C154) sind an der Oberfläche auf der dem aktiven Zentrum abgewandten Seite lokalisiert (Abb. 6.1-1B). Sie liegen zu weit auseinander, um eine intramolekulare Disulfidbrücke auszubilden. Ob bzw. welcher dieser beiden Reste eine Disulfidbrücke zum C26 des Propeptids bildet, kann mit Hilfe dieses Modells nicht sicher vorausgesagt werden.

Da die Cysteinreste C145 und C154 in der reifen Form frei vorliegen, erschien es möglich, dass sie zur Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken und unlöslicher Aggregate beitragen. Die Analyse der Expression der reifen Form unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (s. Abb. 5.1-2) bestätigt die Hypothese der Bildung disulfidverbrückter Aggregate. Zur experimentellen Verifizierung wurden die Cysteine 145 und 154 einzeln und gemeinsam gegen Alanin ausgetauscht. Testexpressionen mit diesen drei Konstrukten führten zu löslichen und enzymatisch aktiven Formen mit Ausbeuten von 1 - 5 mg/l. Basierend auf der enzymatischen Aktivitätsmessung zeigt die Expression der Doppelmutante (rTy Δ C-C145A/C154A) die höchste Ausbeute im Vergleich zur wt-Form (Faktor 300) und den Einzelmутanten (Faktor 4 - 17). Das Konstrukt rTy Δ C-C145A/C154A wurde daraufhin für die präparative Herstellung einer enzymatisch aktiven Form der Tryptase γ verwendet, die im Folgenden als rhTryptase γ bezeichnet wird.

Bei der initialen Beschreibung der Expression der Tryptase γ wurde die katalytische Domäne als Pseudozymogen mit einer Enterokinase (EK)-Prozessierungsstelle in Insektenzellen und in Hefe [26, 88] hergestellt. Im Gegensatz dazu hat die Expression der rhTryptase γ eine Reihe von Vorteilen: Bei der Herstellung der Konstrukte kann die Mutagenese des Propeptids zur Einführung einer EK-Prozessierungsstelle vermieden werden. Insbesondere entfällt die biotechnologische Aktivierung des Pseudozymogens, für die meist Serinproteasen wie Enterokinase [26, 88, 131] oder Cysteinproteasen wie TEV [132] verwendet werden. Da der N-Terminus Ile16 (Chymotrypsin-Nummerierung; s. Abb. 6.2-1) für die Konformation des aktiven Zentrums der Tryptase γ notwendig ist, diese Aminosäure jedoch nicht von Cysteinproteasen an P1' von Substraten akzeptiert wird, ist eine Prozessierung letztendlich nur mit Enterokinase (oder einer anderen Serinprotease) möglich; dies führt zwangsläufig zu einer Kontamination der Tryptase γ mit Enterokinase, einer Serinprotease mit tryptischer Spezifität für basische Aminosäurereste an P1. Schließlich ermöglicht die Expression der aktiven katalytischen Domäne die Isolierung mittels aktivitätsbasierter Affinitätschromatographie, die Degradierungsprodukte sowie fehlgefaltete Proteine entfernt und somit die Isolierung korrekt gefalteter, enzymatisch aktiver rhTryptase γ mit hoher Reinheit sowie Ausbeute begünstigt.

6.1.3 Optimierung der Expression und der präparativen Herstellung

Zur Optimierung der präparativen Herstellung der rhTryptase γ wurde der Einfluss der verwendeten Vektoren bzw. Promotoren und *P. pastoris*-Stämme sowie des Kulturmediums auf die Expressionsausbeute analysiert. Testexpressionen unter Verwendung des induzierbaren Promotors P_{AOX} bzw. des konstitutiven Promotors P_{GAP} zeigten etwas höhere Ausbeuten mit dem konstitutiven System (s. Abb. 5.2-8), wesentliche Unterschiede im Hinblick auf Dauer und Ausbeute der Expression wie bei anderen Proteinexpressionen beschrieben [133], konnten dagegen nicht beobachtet werden. Auch eine vermehrte Degradierung der rhTryptase γ nach Methanolzugabe, die zu einer erhöhten Expression endogener Proteasen der Hefe führen kann [134], wurde nicht beobachtet. Da in der Arbeitsgruppe gute Erfahrungen mit dem Methanol-induzierbaren System bei der Expression anderer Tryptasen gemacht worden waren und die Expression gut gesteuert werden kann, wurde der induzierbare Promotor P_{AOX} gewählt.

Die Expression in verschiedenen Hefestämmen zeigte, dass mit den Stämmen X33 und KM71 ähnliche Ausbeuten, mit GS115 und SMD1168 dagegen geringere Ausbeuten erzielt werden (s. Abb. 5.2-9). Der Mut^S -Stamm KM71 proliferiert in Gegenwart von Methanol langsamer als die Mut^+ -Stämme X33 und GS115, was zu größeren Ausbeuten heterologer Proteine führen kann [133, 135]. Der Protease-defiziente Stamm SMD1168 kann zur Reduktion der Degradierung rekombinant exprimierter Proteine eingesetzt werden [136]. Diese Vorteile konnten bei der Expression der rhTryptase γ jedoch nicht beobachtet werden, sodass im Weiteren der in der Arbeitsgruppe routinemäßig eingesetzte Stamm X33 verwendet wurde.

Im Gegensatz zu den Optimierungsversuchen mit verschiedenen Promotoren und Hefestämmen zeigte die Expression der rhTryptase γ in verschiedenen Medien deutliche Unterschiede. So wurde im Vollmedium eine deutlich höhere Expressionsausbeute als im Minimalmedium erzielt (Faktor 20; s. Abb. 5.2-14). Die Verwendung von Minimalmedium kann die Isolierung rekombinanter Proteine wesentlich erleichtern, führt jedoch häufig zu Problemen bei der rekombinanten Expression, da bei einem $pH \leq 5,5$ Salze ausfallen können [137] und die Stabilität exprimierter Proteine u. a. durch erhöhte Degradierung verringert ist [127, 138].

Nach der Optimierung wurde die Fermentation vom 10 ml-Maßstab über den Schüttelkolben (500 ml) in den Bioreaktor (3000 ml) überführt. Damit wurde die Expressionsausbeute insgesamt um den Faktor 4000 gesteigert (Tab. 6.1-1). Maßgebliche Faktoren sind dabei die Volumenzunahme um den Faktor 300, die Möglichkeit der Fermentation mit hohen Zelldichten, die um den Faktor 10 höher liegen als im Schüttelkolben, und die kontrollierten Bedingungen im Bioreaktor [133]. Bei der Hochskalierung fällt vor allem die hohe

Expressionsausbeute im Bioreaktor im Vergleich zum Schüttelkolben auf (Faktor 200), die u. a. auf die hohe Zelldichte [139] und die bessere Luftzufuhr [140] zurückzuführen ist. Die kontrollierte Zugabe des Methanols verhindert dessen Akkumulation, sodass Komplikationen wie Zelltoxizität [140] sowie geringes Proteinlevel der Zelle reduziert werden [141]. Inzwischen konnten die Ausbeuten durch den Einsatz einer optischen Sauerstoffsonde (VisiFermDO, Hamilton), die eine bessere Sauerstoffregelung im Vergleich zur polarographischen Sonde im Bioreaktor zulässt, nochmals um den Faktor 5 auf 150 mg/l erhöht werden. Insgesamt wurden durch die Optimierung der Bedingungen und Überführung in den Bioreaktor Ausbeuten von etwa 30 mg/l (bzw. 150 mg/l mit VisiFermDO) erreicht. Diese Expressionsausbeuten liegen weit über denen der wt-Form der katalytischen Domäne mit 0,01 mg/l [96] bzw. Yuan *et al.* mit 3 mg/l [26], die im Rahmen der Erstbeschreibung angegeben worden sind. Die erzielten Mengen sind für die geplanten Charakterisierungsstudien und die Kristallographie völlig ausreichend. Sie entsprechen den Expressionsausbeuten von Tryptase α und β mit 12 - 60 mg/l [35, 129], erreichen jedoch nicht die Größenordnung, die mit einigen anderen Proteinen wie z. B. IGF-1 mit 600 mg/l [142] oder Serum-Albumin mit 3 g/l [143] in *P. pastoris* erzielt wurden.

Tab. 6.1-1: Ausbeuten bei der Expression im verschiedenen Maßstab. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM, $n=3$ angegeben. * $n=1$.

	Volumen [ml]	Gesamtaktivität [10^6 U]	Zelldichte [OD ₆₀₀]	Konzentration [mg/l]	Menge [mg]
10 ml	10	0,1 \pm 0,004	21 \pm 3	2,5	0,025
Schüttelkolben	500	2,2 \pm 0,2	28 \pm 6	1	0,5
Bioreaktor	3300	440 \pm 110	310 \pm 25	30	90
Bioreaktor mit VisiFermDO*	2600	2700	345	150	650

6.1.4 Isolierung der rhTryptase γ

Nach der Fermentation wurde die rhTryptase γ aus dem Hefeüberstand über eine vierstufige Reinigung isoliert. Die Fermentation im Vollmedium machte eine initiale Dialyse notwendig, um basische Peptide und Aminosäuren des Mediums zu entfernen. Die anschließende Kationenaustauschchromatographie, ein gut etabliertes und skalierbares Verfahren, das auch für die Reinigung der Tryptase β aus großen Volumina eingesetzt wurde [35, 37, 129], gelang mit einer Ausbeute von ca. 70 % zufriedenstellend. Die abschließende Reinigung mittels Benzamidin-Affinitätschromatographie hat den Vorteil, dass ausschließlich die enzymatisch aktive Protease isoliert wird und damit inaktive Formen (z. B. Fragmente und missgefaltete Proteine) separiert werden [144]. Das dabei verwendete Benzamidin wurde im letzten Schritt durch Dialyse und Konzentrierung über eine Filtermembran auf eine Konzentration im femtomolaren Bereich reduziert. Zusammenfassend wurden durch die

Reinigung 56 mg der rhTryptase γ aus dem Hefeüberstand einer Fermentation isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 63 %, die für eine vierstufige Reinigung als sehr gut zu bewerten ist. Dagegen erzielte die initial geplante Reinigung über den C-terminalen His₆-Tag mittels Metallaffinitätschromatographie geringe Ausbeuten, welche auf eine C-terminale Prozessierung während der heterologen Expression in *P. pastoris* zurückgeführt werden konnte (s. Abb. 5.5-4).

6.1.5 Proteinchemische Charakterisierung der rhTryptase γ

Die rhTryptase γ war nach der Reinigung im SDS-Gel als einzige, aber leicht diffuse Bande bei einem Molekulargewicht von 35 kDa nachweisbar. Die N-terminale Sequenzierung zeigte den korrekten N-Terminus IVGGHA bei > 95 % des Proteins (s. 5.2.5.5, Abb. 6.2-1). Dies verifiziert die korrekte Prozessierung des α -Faktorsignalpeptid/Tryptase γ -Fusionsproteins durch die Hefeprotease KEX2 während der heterologen Expression; auf eine Optimierung der KEX2-Prozessierungsstelle wurde deshalb verzichtet [145, 146]. Auch die Titration der rhTryptase γ mit dem Inhibitor SBTI zeigte eine spezifische Aktivität von > 95 % bezogen auf die Proteinkonzentration (s. Abb. 5.2-20). Unter Beachtung der Messgenauigkeit kann daher von einem homogenen Protein ausgegangen werden.

Die leicht diffuse Bande im SDS-PAGE (s. Abb. 5.2-19) wurde auf die Glykosylierung der rhTryptase γ zurückgeführt. Die rhTryptase γ zeigt eine N-glykosidische Modifikation vom mannosereichen Typ mit einer Molekülmasse von 5 kDa an einer Glykosylierungsstelle, dem Asn85 (Abb. 6.2-1). Dies entspricht der sequenzbasierten Vorhersage [25] sowie den Beobachtungen eines Glykosylierungsereignisses mit ähnlicher Größenordnung von Yuan *et al.* [26]. Diese Glykosylierung führt zu einer gewissen Heterogenität des rekombinanten Proteins, die aufgrund der hohen spezifischen Aktivität aber keinen wesentlichen Einfluss auf die enzymatische Aktivität zu haben scheint.

Das mannosereiche Glykosylierungsmuster in *P. pastoris*-exprimierten Proteinen unterscheidet sich stark vom komplexen Typ bei Säugerzellen [128, 143, 147] und führt dazu, dass heterolog exprimierte Proteine häufig immunogen sind und für therapeutische Zwecke nicht genutzt werden können [148, 149]. Zur Expression humaner Proteine mit humanähnlichem Glykosylierungsmuster werden daher meist Säugerzellen verwendet, aber auch *P. pastoris*-Stämme mit humanisiertem N-Glykosylierungs-*Pathway* wurden beschrieben [150, 151]. Da in dieser Arbeit die funktionelle und die enzymkinetische Charakterisierung der Tryptase γ im Vordergrund stand, wurde auf die Herstellung einer Form mit humanisiertem Glykosylierungsmuster verzichtet.

Die Analyse der Sekundärstrukturen der rhTryptase γ mittels Circular dichroismus-Spektroskopie ergab ein ähnliches Spektrum wie bei der Tryptase β (s. Abb. 5.3-8). Beide Spektren weisen ein für Chymotrypsin-ähnliche Proteasen charakteristisches Minimum bei 230 nm auf [152, 153]. Die Ermittlung der α -Helix und β -Faltblattstrukturen mit etwa 7,5 % bzw. ca. 31 % erbrachte dabei ähnliche Verhältnisse wie bei verwandten Serinproteasen (s. Tab. 5.3-2) [97, 98]. Die Denaturierung der rhTryptase γ führte wie zu erwarten zu einem Verlust der Elliptizität, v. a. bei dem Minimum von 230 nm, wie es auch für verwandte Serinproteasen beschrieben wurde [35, 154, 155] und lässt auf einen Verlust der Sekundärstrukturen schließen.

Zusammenfassend wurden durch die Isolierung große Mengen der rhTryptase γ mit korrektem N-Terminus, hoher apparenter Homogenität sowie hoher spezifischer Aktivität gewonnen. Damit zeigt sich, dass die Mutagenese der Cysteinreste 145 und 154 zu Alanin sowie das Aufreinigungsprotokoll zur Gewinnung löslicher, enzymatisch aktiver rhTryptase γ zielführend ist. Außerdem konnte dadurch die Kontamination durch Proteasen mit tryptischer Substratspezifität, die zur Aktivierung rekombinanter Pseudozymogene verwendet werden müssen, vermieden werden. Schließlich erscheint diese rekombinante reife Form der Tryptase γ für biomedizinische, funktionelle sowie strukturelle Untersuchungen geeignet.

6.2 Rekombinante Expression des Tryptase γ -Zymogens

Zur rekombinanten Expression der wt-Form des Tryptase γ -Zymogens wurde ein Fusionskonstrukt verwendet, bei dem die Prädomäne durch die α -Faktorsignalsequenz und die C-terminale hydrophobe Domäne durch den c-myc-His₆-Tag ersetzt wurden. Die Analyse der rekombinanten Expression des Tryptase γ -Zymogens in *P. pastoris* zeigte, dass diese unveränderte Form zur Sekretion löslichen Proteins in den Hefeüberstand führte (s. Abb. 5.1-2).

Bei der heterologen Expression des Zymogens wurde weitgehend anhand des für die reife Form optimierten Protokolls vorgegangen. Auch hier wurde eine weit höhere Expressionsausbeute im Vollmedium als im Minimalmedium beobachtet (s. Abb. 5.3-1). Nach Expression und Aufreinigung über den C-terminalen His₆-Tag des Proteins wurden insgesamt etwa 9 mg gewonnen. Dies entspricht im Vergleich zur isolierten reifen Form der Tryptase γ mit 56 mg einer relativ geringen Reinigungsausbeute, die z. T. auf die Prozessierung des C-Terminus (WIRR-HITA..) (s. a. 5.5.2, Abb. 6.2-1) und damit auf den Verlust des zur Reinigung benutzten Affinitätstags zurückzuführen ist.

Die Expression von Zymogenen wird häufig als vielversprechender angesehen als die der katalytischen Domäne, da einerseits die Prodomäne die Faltung des reifen Proteins unterstützen kann und somit die Stabilität während der Expression erhöht [156] und

andererseits heterologe, enzymatisch aktive Proteasen zytotoxisch sein können [157]. Diese Beobachtungen wurden jedoch bei der Expression der rhTryptase γ nicht gemacht.

Die proteinchemische Analyse des aufgereinigten Zymogens zeigt, dass das Molekulargewicht mit 37 kDa entsprechend der zusätzlichen Prodomäne mit 18 Aminosäuren um 2 kDa größer ist als das der reifen Form (s. Abb. 5.2-4). Die N-terminale Sequenzierung bestätigte den korrekten N-Terminus mit RTLQ... (Abb. 6.2-1) mit einer Reinheit von > 98 % und somit die korrekte Prozessierung durch die KEX2 Protease. Die Detektion des C-terminalen His₆-Tags mittels anti-His₆-Antikörper verifiziert zusätzlich den C-Terminus und die Vollständigkeit des isolierten Proteins.

Bei der Analyse des isolierten Zymogens mittels SDS-PAGE und Immunblot fällt ein Anteil hyperglykosyliertes Protein auf, der zu einer diffusen Bande bei einem Molekulargewicht > 50 kDa führt (s. Abb. 5.3-5). Ähnliche Hyperglykosylierungen mit bis zu 200 Mannose-resten (ca. 30 kDa) wurden auch bei der Expression von Tryptase α und β beobachtet [35], sie treten bei Proteinen mit nur einer Glykosylierungsstelle wie z. B. bei der rMCP7 gehäuft auf [158].

Bei der Untersuchung der Sekundärstrukturen mittels CD-Spektroskopie (s. Abb. 5.3-8) zeigt das Spektrum des Zymogens eine geringe Elliptizität, das weitgehend analog zu dem der denaturierten rhTryptase γ verläuft. Zudem ergibt die Ermittlung der Anteile der α -Helix- sowie β -Faltblattstrukturen mittels K2D2- bzw. K2D3-Software ca. 2 % bzw. ca. 46 %, die den Anteilen der denaturierten Form entsprechen. Der Verlust der Elliptizität im fernen UV-Licht im Vergleich zur katalytischen Domäne wurde auch bei Zymogenen anderer Trypsin-ähnlicher Serinproteasen beobachtet [152, 154, 159, 160]. Dies lässt auf ein weitgehend ungefaltetes Zymogen der Tryptase γ schließen.

Während der Expression und nach der Aufreinigung konnte keine enzymatische Aktivität des Zymogens nachgewiesen werden, sodass eine Autoaktivierung auch bei hohen Konzentrationen auszuschließen ist. Dagegen war es möglich, das Zymogen durch Inkubation mit Trypsin zur enzymatisch aktiven Protease zu prozessieren. Die enzymatische Aktivität des prozessierten Zymogens entspricht der der rhTryptase γ mit einem Umsatz von 13,9 bzw. 14,3 nM AMC/s/nM Protein (s. Abb. 5.3-7). Das biotechnologisch prozessierte Zymogen validiert damit die Aktivität der rhTryptase γ . Gleichzeitig zeigt es, dass die Hyperglykosylierung und die apparent fehlenden Sekundärstrukturen in der CD-Spektroskopie des Zymogens keinen Einfluss auf die korrekte Faltung sowie enzymatische Aktivität der aktivierten Form haben.

		Signalpeptid		Prodomäne	
Tryptase γ	1	MALGACGLLLLLLAVPGVSL-----	RTLQPGCGRPQVSDAGGR	37	
Tryptase β	1	MLN-----LLLLALPVLASRAYA----	APAPGQALQVRG-----	30	
Tryptase α	1	MLS-----LLLLALPVLASRAYA----	APAPVQALQQAG-----	30	
Trypsin	1	MNPLLLILTFVAAALAAPFDDDK-----		23	
		* . * .	****		
◆					
Tryptase γ	38	--IVGGHAAPAGAWPWQASLRRLRR---	VHVCGLSLLSPQWVLTAA	77	
Tryptase β	31	--IVGGQEA PRSKWPWQVSLRVRDRYWMHFCGSLIHPQWVLTAA	73		
Tryptase α	31	--IVGGQEA PRSKWPWQVSLRVRDRYWMHFCGSLIHPQWVLTAA	73		
Trypsin	24	--IVGGYNCEENSVPYQVSLNSGY----	HFCGSLINEQWVVSAG	62	
		***** . * * *	* ***** . *** . *		
37 loop					
Tryptase γ	78	ECFSGSLNS-SDYQVHLGELEITLSP---	HFSTVRQIILHSSPSG	118	
Tryptase β	74	ECVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQD---	QLLPVSRIIVHP-QFY	114	
Tryptase α	74	ECVGPDVKDLATLRVQLREQHLYYQD---	QLLPVSRIIVHP-QFY	114	
Trypsin	63	ECYK-----SRIQVRLGEHNIEVLEGNEQFINAAKIIRHP-QYD	100		
		** . . * * *		
60 loop 70 - 80 loop					
Tryptase γ	119	QPGTSGDIALVELSVPTLSSRILPVC	LPESDDFC	PGIRCWVTG	163
Tryptase β	115	TAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMP	CWVTG	159	
Tryptase α	115	IIQTGADIALLELEEPVNISSRVHTVMLPPASETFPPGMP	CWVTG	159	
Trypsin	101	RKTLNNDIMLIKLSRAVINARVSTISLPTAPP--	ATGKCLISG	143	
		** * . *	* * * . *	
97 loop					
Tryptase γ	164	WGYTREGEPLPPPYSLEVKVSVVDTE	TCCR-----	DYPGPGGSI	203
Tryptase β	160	WGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRI	204		
Tryptase α	160	WGDVDNDEPLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRI	204		
Trypsin	144	WGNTASSG-ADYPDELQCLDAPVLSQAKCEAS-----	YPG-----K	178	
		** . *	* * *		
147 loop 173 flap					
Tryptase γ	204	LQPDMLCARGP---GDACQDDSGGPLVCQVNGAWVQAGIVSWGEG	245		
Tryptase β	205	VRDDMLCAGNTR--RDSQGDSSGGPLVCVNGTWLQAGVVS	WEG	247	
Tryptase α	205	IRDDMLCAGNSQ--RDSCKGDSGGPLVCVNGTWLQAGVVS	WEG	247	
Trypsin	179	ITSNMFCVGFLEGGKDSQGDSSGGPVVCNG-----	QLQGVVSWGDG	219	
		. * * . * . * . * . *	* . * . * . *		
Transmembran					
Tryptase γ	246	CGRPNRPGVYTRVPAYVNWIRRHITTASGSGESGYPRLLLAGFF	290		
Tryptase β	248	CAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVKKP-----	274		
Tryptase α	248	CAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVKKP-----	275		
Trypsin	220	CAQKNKPGVYTKVYNYVKWIKNTIAANS-----	247		
		* . * . * . * . * . *	* . * . *		
Region					
Tryptase γ	291	LPGLFLLLVSCVLLAKCLLHPSADGTPFPAPD	322		
Tryptase β	275	-----	274		
Tryptase α	276	-----	275		
Trypsin	248	-----	247		

Abb. 6.2-1: Sequenzalignment der Tryptasen α , β , γ und Trypsin. Die Aminosäuresequenzen der Tryptase α (Referenzsequenz NCBI: AAA 86934), der Tryptase β (Referenzsequenz NCBI: NP077078), der Tryptase γ (Referenzsequenz NCBI: NP036599) und Trypsin (Referenzsequenz Uniprot: P07477) wurden mittels Clustal W verglichen. Die Aminosäuren His57*, Asp102* und Ser195* der katalytischen Triade sind rot markiert. Die Aminosäure Asp189* (violett) ist für die Trypsin-ähnliche Substratspezifität für basische Aminosäuren in der S1-Bindungstasche verantwortlich. Das Gly216* (hellgrün) führt zur Ausbildung einer offenen S1-Bindungstasche. Die nicht-konservierten Cysteinreste 145 und 154 der Tryptase γ sind hellblau markiert. Die Raute markiert den N-Terminus der katalytischen Domäne Ile16*. Die Domänenstruktur ist oberhalb der Sequenz angezeigt. Die sechs Oberflächenloops, die zur Tetramerisierung der Tryptase β führen, sind unterhalb der Sequenz angezeigt. Die Glykosylierungsstelle Asn85 ist orange markiert. * Chymotrypsin-Nummerierung.

6.3 Regulationsmechanismen der rhTryptase γ

6.3.1 Prozessierung des Zymogens

Mit Hilfe des rekombinanten Zymogens war es erstmals möglich, den Aktivierungsmechanismus der Tryptase γ zu untersuchen. Aufgrund des Restes R-1 (bzw. R37) im Propeptid (Abb. 6.2-1) muss davon ausgegangen werden, dass das Tryptase γ -Zymogen durch eine Protease mit tryptischer Spezifität aktiviert wird. Auch nach längerer Lagerung des Zymogens und Inkubation mit aktiver rhTryptase γ (im sauren und neutralen Milieu) wurde keine Zunahme der enzymatischen Aktivität beobachtet, sodass eine Autoaktivierung, trotz passender Trypsin-ähnlicher Spezifität, ausgeschlossen werden kann (s. Abb. 5.5-3).

Trypsin ist in der Lage, das Tryptase γ -Zymogen vollständig zu aktivieren (s. Abb. 5.3-7), kommt jedoch als Protease des Verdauungssystems als physiologisch relevanter Aktivator nicht in Betracht. Daher wurde die Aktivierung durch Proteasen analysiert, die mit Tryptase γ co-exprimiert bzw. co-lokalisiert sind wie Proteasen der Mastzell-Granula (monomere und tetramere Tryptase β) [44], Proteasen, die Tryptase β in Mastzellen aktivieren (Cathepsin C, L und B) [38, 161] sowie Proteasen der Zirkulation (t-PA, Urokinase, Elastase, Thrombin, Plasmin, Kallikrein), die das sezernierte Zymogen aktivieren könnten. Dabei wurde gezeigt, dass das Zymogen durch monomere Tryptase β im sauren pH zu einer aktiven Form prozessiert wird, die der rhTryptase γ entspricht (s. Abb. 5.5-2). Es konnte jedoch keine signifikante Aktivierung durch die anderen Proteasen beobachtet werden (s. Abb. 5.5-3). Damit unterscheidet sich der Aktivierungsmechanismus der Tryptase γ wesentlich von den Cathepsin C-abhängigen Prozessierungen anderer Tryptasen und Granula-assoziierten Proteasen [87]. Aufgrund der Co-Lokalisierung der Tryptase γ mit Tryptase β [19, 24], die im sauren Milieu der Mastzell-Granula als Monomer enzymatisch aktiv sein kann [44, 109, 162], erscheint monomere Tryptase β als relevanter physiologischer Aktivator. Um die Prozessierung unter physiologischen Bedingungen zu validieren, sind Studien mit Tryptase β Genexpression-*knockdown* in Mastzellen sowie im Tiermodell geplant.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Tryptase γ in den Granula vollständig aktiviert wird und aufgrund ihres breiten pH-Optimums (s. Abb. 5.5-7) dort auch aktiv ist, jedoch durch Interaktion mit Salzen und v. a. Histamin gehemmt wird (s. Abb. 5.5-8). Dies entspricht annähernd der Regulation der Aktivität der Tryptase β , die ebenfalls durch Salze und Histamin gehemmt wird und darüber hinaus durch das saure Milieu in den Granula limitiert wird. Die Regulation der enzymatischen Aktivität von Serinproteasen durch Salze wurde auch für die verwandte Transmembran-Protease Prostatin und die Kallikreine KLK2, KLK4, KLK5 und KLK7 beschrieben [110, 163-165]. Die Interaktion ist jeweils auf unterschiedliche strukturelle Voraussetzungen zurückzuführen und muss für rhTryptase γ noch geklärt werden.

Bei der initialen Expression des Pseudozymogens der Tryptase γ mit Enterokinase (EK)-Schnittstelle wurde nach Prozessierung mit EK eine Disulfid-abhängige Zweikettenform beobachtet [26, 88], wie sie auch bei verwandten Proteasen wie Proctasin vorkommen [166]. Dagegen wurde in dieser Arbeit die Wildtypform des Zymogens exprimiert, bei dem sowohl nach Prozessierung mit Trypsin als auch mit monomerer Tryptase β keine Zweikettenform beobachtet wurde. Aufgrund eines zusätzlichen Argininrestes R28 (GCGR↓) (Abb. 6.2-1) erscheint es möglich, dass das Propeptid durch Trypsin bzw. mTryptase β weiter prozessiert wird; angesichts der Substratspezifität der Enterokinase mit DDDK/R↓ (Merops S01.156) [99] scheint dies jedoch bei der Prozessierung des Pseudozymogens ausgeschlossen. Daher wird basierend auf den Ergebnissen mit der Wildtypform des Tryptase γ -Zymogens in dieser Arbeit von einer Zweikettenform ausgegangen, bei der die leichte Kette weiter prozessiert wird. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Tryptase γ wie Tryptase β in aktiver Form in Mastzell-Granula vorliegt, aber aufgrund der hydrophoben Domäne in der Granula- bzw. Zellmembran verankert ist [88] (Abb. 6.3-1).

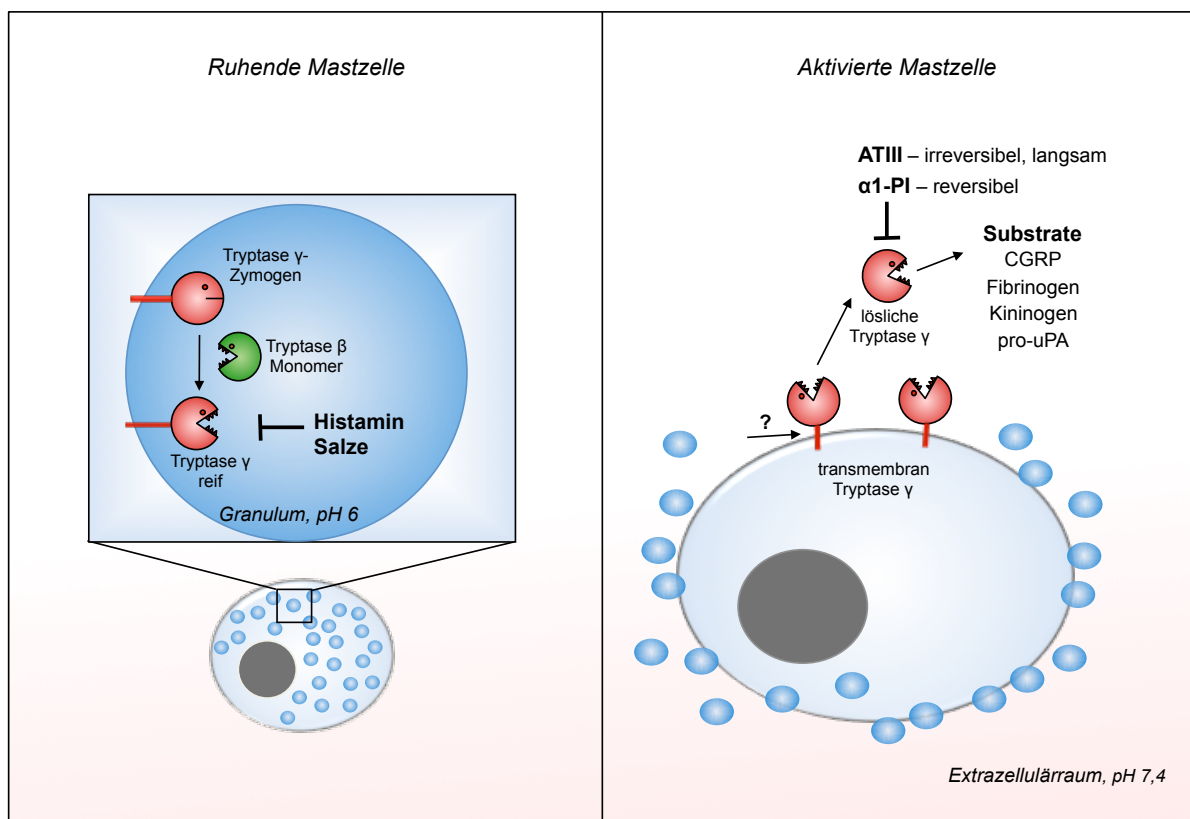


Abb. 6.3-1: Schematische Darstellung der potenziellen Regulation der Tryptase γ . Die Untersuchungen dieser Arbeit lassen vermuten, dass das Tryptase γ -Zymogen in den Granula der Mastzelle durch monomere Tryptase β prozessiert wird. Die enzymatische Aktivität der reifen Form der Tryptase γ kann in den Granula durch Interaktion mit Histamin und Salzen reguliert werden. Nach Aktivierung der Mastzelle ist die Tryptase γ in der Zellmembran verankert. Die Identifizierung einer Prozessierungsstelle zwischen katalytischer und Transmembran-Domäne WIRR-HITA lässt eine Abspaltung der Ektodomäne vermuten, die zu einer löslichen Form der Tryptase γ im Extrazellulärraum führen würde. Diese könnte peptidische und proteinartige Substrate wie CGRP, Fibrinogen, Kininogen sowie pro-uPA prozessieren und wäre im Serum weitgehend stabil. Erst in einer langsamen Reaktion würde die Interaktion mit ATIII zu einer Inaktivierung der Tryptase γ führen.

6.3.2 Abspaltung der Ektodomäne und Aktivität im Extrazellulärraum

Während der heterologen Expression der rhTryptase γ in *P. pastoris* wurde eine Prozessierung des C-Terminus beobachtet, die zum Verlust des C-terminalen Tags führt (s. Abb. 5.5-4). Da die Prozessierung ebenso beim (inaktiven) Zymogen und einer inaktivierten Form (rTy Δ C-S195A) auftrat (s. Abb. 5.3-3, Abb. 5.4-2), kann eine autokatalytische Spaltung ausgeschlossen werden. Die Schnittstelle zwischen RR↓H (R267-H268), die durch Isolierung des C-terminalen Fragments identifiziert wurde, lässt auf die Prozessierung durch eine Furin-ähnliche Protease (wie KEX2 der Hefe) schließen (Merops Datenbank, Clan SB, Familie S8) [167]. Damit kann - wie auch bei anderen Typ I Transmembran-Proteasen - die Ektodomäne der Tryptase γ durch eine andere Protease, einer sog. *Sheddase* abgespalten und freigesetzt werden. Dieser Prozess ist zur Terminierung oder zur Translokation der proteolytischen Aktivität physiologisch relevant [168-170].

Die ersten Hinweise auf ein *Shedding* der Tryptase γ lieferten Verghese *et al.* [93]. Nach dem genetischen Austausch des C-terminalen Fragments des Prostasins mit dem der murinen Tryptase γ (264 - 311; Tpsg1) und Überexpression in murinen myeloischen Vorläuferzellen (M-1 Zellen) wurde ein *Shedding* beobachtet. Die für die Abspaltung der Ektodomäne verantwortliche Protease wurde dabei nicht identifiziert. Der C-Terminus der Tryptase γ von Maus und Mensch unterscheiden sich etwas: Die furinartige Schnittstelle RR↓H ist im murinen C-Terminus nicht konserviert, sondern durch die Aminosäuren HHH ersetzt. Daher kann es sich im murinen C-Terminus um eine andere bzw. zusätzliche Spaltstelle handeln oder die *Sheddase* der murinen Zellen hat eine breitere Substratspezifität, die die Spaltung an der gleichen Stelle erlaubt. In einem parallelen Projekt in unserer Arbeitsgruppe wurde humane Tryptase γ in der Mastzelllinie HMC-1 überexprimiert. Dabei wurde ebenfalls eine Abspaltung der Ektodomäne beobachtet, das Molekulargewicht des Spaltprodukts lässt dieselbe Schnittstelle vermuten wie sie bei rhTryptase γ identifiziert wurde (T. Schmidt, Dissertation eingereicht [171]).

Die C-terminale Prozessierung der rekombinanten rhTryptase γ impliziert ihre Freisetzung und biologische Aktivität im Extrazellulärraum (EZR). Die funktionellen Untersuchungen der rhTryptase γ zeigen, dass rhTryptase γ mit ihrem breiten pH-Optimum (s. Abb. 5.5-7) im EZR sowohl unter physiologischen Bedingungen mit einem pH von 7,4 als auch unter pathophysiologischen Bedingungen wie z. B. Hypoxie, Wundheilung und Tumor, die mit einer extrazellulären Ansäuerung einhergehen [172-175], enzymatisch aktiv ist. Die Untersuchung der Interaktion der rhTryptase γ mit den Serpinen α 1PI und ATIII zeigte, dass rhTryptase γ im Gegensatz zu anderen Serinproteasen von α 1PI reversibel gehemmt wird (s. Abb. 5.5-21) und von ATIII nur in einer sehr langsamen Reaktion inaktiviert wird (s. Abb. 5.5-22). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Tryptase γ im Extrazellulärraum eine biologische

Aktivität mit einer langen Halbwertszeit hat. Insgesamt implizieren die Ergebnisse ein *Shedding*-Ereignis der Tryptase γ , das zu einer Translokation und schließlich in einer verzögerten Reaktion zur Terminierung ihrer proteolytischen Aktivität führt (Abb. 6.3-1). Um das *Shedding* der humanen Tryptase γ näher zu untersuchen, wurde bereits mit der Expression in humanen Mastzelllinien begonnen. Anhand von Mutationen potenzieller Schnittstellen sowie *knockdown*-Experimenten kann dann die physiologisch relevante *Sheddase* identifiziert werden.

6.3.3 Substratspezifität der rhTryptase γ

Tryptase γ wird aufgrund der konservierten Aminosäuren der katalytischen Triade (His57, Asp102, Ser195; Chymotrypsin-Nummerierung) [176] zur Familie der Serinproteasen gezählt (Abb. 6.2-1). Das Asp189 in der S1-Bindungstasche lässt eine tryptische Substratspezifität erwarten, d. h. die Spaltung von Substraten C-terminal von basischen Aminosäuren [177]. Die Aminosäure Gly216 sollte wie bei Tryptase β zur Ausbildung einer offenen S1-Bindungstasche in enzymatisch aktiver Konformation führen, während sie bei Tryptase α aufgrund eines Aminosäureaustauschs zu Asp216 geschlossen ist [30].

Die Analyse der Substratspezifität mittels Peptidsubstraten und *Position Scanning Libraries* bestätigt diese Prädiktionen. Die rhTryptase γ akzeptiert die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin an Position P1 des Substrats und zeigt dabei eine Präferenz für Arginin über Lysin (s. Abb. 5.5-10), wie sie für Trypsin-ähnliche Serinproteasen typisch ist [178] und durch den Aminosäurerest Ala190 bedingt wird [179]. Diese Präferenz wurde ebenso bei verwandten Proteasen wie Mastin [180] und Prostasin [110] beschrieben, während Tryptase β mit einem Serin an Position 190 beide basischen Aminosäuren gleichwertig akzeptiert [179].

Besonders auffällig ist die Präferenz der rhTryptase γ für Substrate mit großen, hydrophoben Aminosäureresten an Position P2 (s. Abb. 5.5-12). Eine ähnliche Spezifität ist auch von den Proteasen Prostasin [110] und Plasmin [181] bekannt, während z. B. Thrombin [182, 183] sowie Matriptase und Hepsin [184] v. a. kleine, unpolare Aminosäurereste bevorzugen. Tryptase β favorisiert dagegen Substrate mit polaren Aminosäureresten an P2 (s. Abb. 5.5-12) [36], ähnlich wie Trypsin [185]. Die rhTryptase γ zeigt an den Positionen P3 und P4 gewisse Präferenzen für polare bzw. unpolare Aminosäurereste, während Tryptase β hier deutlich weniger zwischen einzelnen Aminosäureresten diskriminiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Substratspezifität der beiden Tryptasen insbesondere an Position P2 unterscheidet und dabei weitgehend komplementär ist: Die rhTryptase γ bevorzugt die Aminosäuren Phe, Trp sowie Tyr, während Tryptase β alle anderen Aminosäuren bis auf Arg akzeptiert.

Um die Relevanz der Unterschiede in der mittels *Position Scanning Libraries* identifizierten Spezifität zu untersuchen, wurde die Prozessierung natürlicher Peptid- und Proteinsubstrate durch Tryptase β und rhTryptase γ verglichen. Dabei ist bemerkenswert, dass zwei von drei untersuchten Peptidsubstraten (s. Abb. 5.5-13, Abb. 5.5-14) sowie alle Proteinsubstrate (Kininogen, Fibrinogen und pro-uPA) durch Tryptase β und rhTryptase γ prozessiert werden (s. Abb. 5.5-16, Abb. 5.5-17). Die unterschiedlichen Spaltprodukte reflektieren dabei wahrscheinlich die Diversität in der P2-Spezifität der beiden Tryptasen. Zudem fällt auf, dass die Prozessierung des CGRP durch rhTryptase γ von ihrer Substratspezifität abweicht. Dies zeigt, dass die Untersuchung der Substratspezifität mit *Position Scanning Libraries* nur bedingt Aufschluss auf natürliche Substrate liefern kann. Dies kann u. a. dadurch erklärt werden, dass bei diesen Substratbibliotheken die *non-prime* Seite (Positionen P1'-P4') nicht betrachtet wird, was z. B. durch die Verwendung von FRET-basierten Substraten [186] oder *Proteome-derived* Substratbibliotheken wie PICS [187] vermieden werden kann.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass rhTryptase γ Trypsin-ähnliche Substratspezifität besitzt und im Gegensatz zu Tryptase β Arginin über Lysin an Position P1 bevorzugt. Die enzymatisch aktiven Tryptasen unterscheiden sich am stärksten in der Präferenz für Aminosäurereste an Position P2. Andererseits ergänzen sich die komplementären Substratspezifitäten an dieser Position, sodass ein breites Spektrum an Substraten (mit basischen Aminosäuren an P1) von beiden Tryptasen zusammen gespalten werden kann. Die Spaltung natürlich vorkommender Peptid- und Proteinsubstrate bestätigt diese Spezifität, die jedoch zu unterschiedlichen Degradierungsprodukten führt. Diese Beobachtungen lassen eine überlappende und potenziell synergistische Substratspezifität der beiden Tryptasen vermuten. Um weitere natürliche Substrate der Tryptasen zu identifizieren, sollen nun proteomweite Ansätze wie TAILS [188] oder CLIP-Chip [189] verwendet werden.

6.3.4 Strukturelle Untersuchungen der rhTryptase γ

Bei Tryptase β , die als Heparin-stabilisiertes Tetramer enzymatisch aktiv ist, werden die Monomer-Monomer-Kontakte über sechs Oberflächenloops ausgebildet, die sich in Länge und Konformation von denen archetypischer Serinproteasen unterscheiden (Abb. 6.2-1) [41]. Im Modell der Tryptase γ -Struktur (Abb. 6.1-1) unterscheiden sich zwei der sechs Loops (173 und 37 Loop) wesentlich in ihrer Länge von denen der Tryptase β , während die anderen vier Oberflächenloops in ihrer Länge und z. T. in ihrer Konformation weitgehend identisch sind. Damit war es nicht möglich, anhand des Modells eine zuverlässige Aussage über die Quartärstruktur der Tryptase γ zu treffen. Die Untersuchung der Quartärstruktur der rhTryptase γ mittels Gelfiltration bestätigt die Annahme, dass Tryptase γ als Monomer enzymatisch aktiv ist. Auch die Interaktionen der rhTryptase γ mit makromolekularen

Serpinen ATIII sowie α 1PI lassen auf eine monomere Struktur schließen. Die Tryptase β -Tetramere werden zudem durch die Bindung an Heparin stabilisiert [35, 41]; eine Affinität, Bindung oder Abhängigkeit von rhTryptase γ an Heparin, die eine Oligomerisierung unterstützen könnten, wurde hier nicht beobachtet (s. Abb. 5.5-6).

Bei der Expression der wt-Form der katalytischen Domäne der Tryptase γ wurde eine disulfidverbrückte Aggregatbildung oder Oligomerisierung beobachtet (s. Abb. 5.2-4). Dies erinnert an Mastin, die Tryptase des Hundes, die über vier nicht-klassische Cysteinreste disulfidverbrückte Dimere, Octamere und Dodecamere ausbildet [24, 190]. Der Aminosäuresequenzvergleich von Tryptase γ mit Mastin zeigt, dass keiner der vier Cysteinreste von Mastin (Abb. 6.3-2, blau markiert) in der Polypeptidkette der Tryptase γ konserviert ist. Außerdem sind die beobachteten Disulfid-abhängigen Aggregate der wt-Form der Tryptase γ (s. Abb. 5.2-5) im Gegensatz zu den Mastin-Oligomeren nicht enzymatisch aktiv. Insgesamt liefern die Ergebnisse und die bioinformatischen Analysen keine Hinweise auf eine Oligomerisierung der Tryptase γ , sodass wir davon ausgehen, dass Tryptase γ als Monomer enzymatisch aktiv ist. Dies entspricht auch den Beobachtungen von Caughey *et al.* [25], die mittels Immunblot keine disulfidverbrückten Oligomere der Tryptase γ in HMC-1 Lysaten detektierten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Oligomerisierung der Tryptase γ unter (patho)physiologischen Bedingungen stattfinden kann.

Tryptase γ	1	MALGACGLLLLLLAVPGVSLRTLQPG	50
Mastin	1	-----MLWLLVLTAPWLGGSVPISPDPGLRHEQVGIVGGCKVPARRYP	43
		. * * * . * * * . * * * . * * *	
Tryptase γ	51	WQASLRRLR-----RVHVC	93
Mastin	44	WQVSLRFHGMGSGQWQHIC	93
		** * * * . * . * * * * . * * * * * * * * . * . . * . .	
Tryptase γ	94	GELEITLSPHFSTVRQIILHS--SPSGQPGTSGDIALVELSVPTLSSRI	141
Mastin	94	GQLRLYDHDQLCNVTEIIRHPNFMNSWYGWDSADIALLKLEAPLTSEDV	143
		* . * * . * * * . * * * * . * * * * . * * * * .	
Tryptase γ	142	LPVCLPEASDDFC	191
Mastin	144	NLVSLPSPSLIVPPGMLC	193
		* . * * * . * * * * * * * * . * * * * * * * * . * .	
Tryptase γ	192	CRRDYP---GPGGSILQPDMLC	237
Mastin	194	CNCHYQTILEQDDEVIKQDMLC	243
		* * * . . . * . * . *	
Tryptase γ	238	GIVSWGEGCGRPNRPGVYTRVPAYVNWIRRHITASGGSES	287
Mastin	244	GVVSWGYGCG-YNLPGVYARVTSYVSWIHQHIPLSPGP-----	280
		* . *	
Tryptase γ	288	FFLPGLFLLLVSCVLLAKCLLHPSADGTPFPAPD	321
Mastin	281	-----	280

Abb. 6.3-2: Aminosäuresequenzvergleich der wt-Tryptase γ und Mastin. Alignment der Aminosäuresequenzen der Tryptase γ (NP036599) und des Mastins (Uniprot P19236) mittels Clustal W. Die nicht-klassischen Cysteinreste des Mastins (C35, C105, C196, C238) [190], die in die disulfidverbrückte Oligomerisierung involviert sind, sind blau markiert. Die Cysteinreste C26, C145 und C154 der Tryptase γ sind gelb markiert. Klassische Cysteinreste, die in Polypeptidketten von Tryptase β und Trypsin konserviert sind, sind grau markiert.

6.4 Entwicklung von Assays für rhTryptase γ

6.4.1 Synthese spezifischer Substrate zur Detektion der rhTryptase γ

Zur Identifizierung biologischer Funktionen von Proteasen *in vitro* und *in vivo* sind aktivitätsbasierte Assays vorzuziehen [191], da aufgrund posttranslationaler Regulationsmechanismen wie Zymogenaktivierung, endogene Inhibitoren, Cofaktoren und Lokalisierung klassische Methoden auf RNA/Transkriptions- oder Proteinebene nur bedingt geeignet sind [192, 193]. Für diese aktivitätsbasierten Analysen werden möglichst selektive und sensitive Peptidsubstrate benötigt. Um geeignete Substrate für rhTryptase γ zu identifizieren, wurde die Spezifität mittels *Hybrid Combinatorial Substrate Libraries* (HyCoSuL) analysiert; diese Substrate besitzen an P1 einen Argininrest und an den Positionen P2-P4 neben den natürlichen Aminosäuren auch nicht natürlich vorkommende Aminosäurederivate, um die Sensitivität und Selektivität zu erhöhen [194, 195]. Aufgrund der Co-Expression und Co-Lokalisierung wurde Tryptase β zum Vergleich mitgeführt.

Die rhTryptase γ zeigt mit Substraten, die nicht-natürliche Aminosäurereste enthalten, weitaus höhere enzymatische Aktivität als mit Substraten, die nur aus natürlichen Aminosäuren bestehen (s. Abb. 5.6-1, Abb. 5.6-2, Abb. 5.6-3). Insbesondere an P2 werden Substrate mit den Tyrosin- und Phenylalaninderivaten L-Tyr(Bzl) bzw. L-Phe(NH₂) mit höherer Aktivität (Faktor 9 bzw. 3) gespalten als Substrate mit den entsprechenden natürlichen Aminosäureresten. Analog bevorzugt rhTryptase γ an P3 sowie P4 die Arginin-derivate (z. B. L-Dab und L-Orn) bzw. cyclischen Derivate (L-Oic und L-Chg) gegenüber den natürlichen Aminosäureresten. Im Gegensatz zu rhTryptase γ präferiert Tryptase β Substrate mit nicht-natürlichen statt natürlichen Aminosäureresten nur an P4. Insgesamt reflektieren die Ergebnisse die zuvor durchgeführten Analysen mit natürlichen Aminosäuren und korrelieren mit denen von Yuan *et al.* [26] bzw. Harris *et al.* [36].

Basierend auf den Ergebnissen wurden fluorogene Peptidsubstrate für rhTryptase γ mit ACC (7-Amino-4-carbamoylmethylcoumarin) als Fluorophor bzw. *leaving group* synthetisiert (s. Tab. 5.6-2). Die Substrate besitzen an P1 Arginin, das von beiden Tryptasen gebunden wird, und an P3 Glutamat, das von Tryptase β nicht akzeptiert wird. An P2 sowie P4 wurden große hydrophobe (L-Phe(NH₂), L-Phe(4Me), L-Trp) bzw. cyclische, unpolare Reste (L-Chg, L-Phg, L-Hnv) verwendet. Die Bestimmung der katalytischen Kenngrößen zeigt, dass rhTryptase γ zwei (mit P2 = L-Phe(NH₂), P4 = L-Chg bzw. L-Phg) der sechs untersuchten Substrate um den Faktor 4 - 12 besser umsetzt als das bisher verwendete Substrat Z-Phe-Arg-AMC. Diese Substrate werden von Tryptase β etwa um den Faktor 100 und von Trypsin und Thrombin um den Faktor 10 - 300 weniger effizient umgesetzt (s. Tab. 5.6-3). Im Vergleich dazu beschreibt Yuan *et al.* (2006) [26] das Substrat Ac-Orn-Phe-Arg-AMC, dass von Tryptase γ lediglich um den Faktor 4 effizienter gespalten wird als von Tryptase β ,

allerdings eine 30-fach höhere katalytische Effizienz aufweist als die hier untersuchten Substrate. Somit sind die hier untersuchten Substrate im Vergleich zu Yuan *et al.* [26] zwar weniger sensitiv, jedoch wesentlich spezifischer und eignen sich damit besser zur Differenzierung der enzymatisch aktiven Tryptasen in *in vitro* und *in vivo*.

Zur Steigerung der Sensitivität werden basierend auf dem Substrat Ac-Chg-Glu-Phe(NH₂)-Arg-ACC momentan weitere Aminosäurereste wie Tyrosinderivate an P2, Serin bzw. Threonin an P3 und L-Oic an P4 untersucht. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Entwicklung spezifischer Substrate zur Differenzierung der Tryptasen vielversprechend ist. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität können diese Substrate für die Synthese von substratbasierten Proben mit Fluorophor und Quencher [196] sowie aktivitätsbasierten Proben mit einer kovalent gebundenen funktionellen Gruppe und einem Detektions-Tag (z. B. Fluorophor oder Biotin) [197, 198] genutzt werden.

6.4.2 Identifizierung von Inhibitoren der rhTryptase γ

Zur Identifizierung von rhTryptase γ -Inhibitoren wurden sowohl natürlich vorkommende und synthetische Inhibitoren Trypsin-ähnlicher Proteasen (ca. 100) als auch in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit N. Schaschke (Hochschule Aalen; ca. 50) und mit der Fa. Altana (Konstanz; ca. 790) entwickelten Tryptase β -Inhibitoren untersucht. Unter den knapp 1000 untersuchten Substanzen wurden nur acht reversible Inhibitoren identifiziert, die die Aktivität der rhTryptase γ mit einer Dissoziationskonstante $K_i \leq 100 \mu\text{M}$ signifikant hemmen.

Unter den Inhibitoren tryptischer Proteasen sind Substanzen, die die enzymatische Aktivität einer oder beider Tryptasen hemmen (Abb. 6.4-1). RhTryptase γ wird von großen, proteinartigen Inhibitoren wie Ecotin sowie SBTI und mit geringerer Affinität auch von LBTI gehemmt, während Tryptase β von kleinen Inhibitoren wie rLDTI, Nafamostat und Gabexat gehemmt wird. Daneben wurden Inhibitoren identifiziert, die ähnliche Affinitäten gegenüber beiden Tryptasen zeigen, so z. B. Antipain und Arg15-Aprotinin.

Unter den in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit N. Schaschke und mit der Firma Altana entwickelten Tryptase β -Inhibitoren bzw. Kopfgruppen konnte keine Substanz identifiziert werden [46, 199-202], die rhTryptase γ signifikant hemmt. Dagegen hemmt ein kommerzieller Tryptase β -Inhibitor, APC-366, die beiden Tryptasen mit ähnlicher Affinität ($K_{i\beta} = 22 \mu\text{M}$ vs. $K_{i\gamma} = 81 \mu\text{M}$). Dieser Inhibitor, der zur spezifischen Hemmung von Tryptase β entwickelt wurde, wurde bis in klinische Phase II Studien zur Behandlung von Asthma evaluiert [203, 204]. Darüber hinaus wurde mit Hilfe dieses Inhibitors die biologische Funktion der Tryptase β u. a. in Tiermodellen für Asthma [68] und hepatischer Fibrose [114] sowie mit humanen Lungenzellen [115] untersucht. Da dieser Inhibitor jedoch nur wenig

zwischen den Tryptasen differenziert, sind die Effekte potenziell auf die Inhibition der Tryptase γ und nicht allein auf die der Tryptase β zurückzuführen.

Zur spezifischen Inhibition der rhTryptase γ wurden große proteinartige Inhibitoren identifiziert, die sich zur Diskriminierung der Tryptasen in Modellsystemen und in *in vitro*-Studien (wie z. B. zur Titration) eignen. Jedoch konnten keine spezifischen synthetischen Inhibitoren identifiziert werden, die für selektive Analysen der rhTryptase γ in *in vivo* Studien anwendbar sind oder als Basis für die biotechnologische Entwicklung sensitiver Inhibitoren genutzt werden können. Daher sollen in Zukunft spezifische und sensitive Inhibitoren gegen rhTryptase γ basierend auf der Kristallstruktur und der mittels Bibliotheken ermittelten Substratspezifität entwickelt werden.

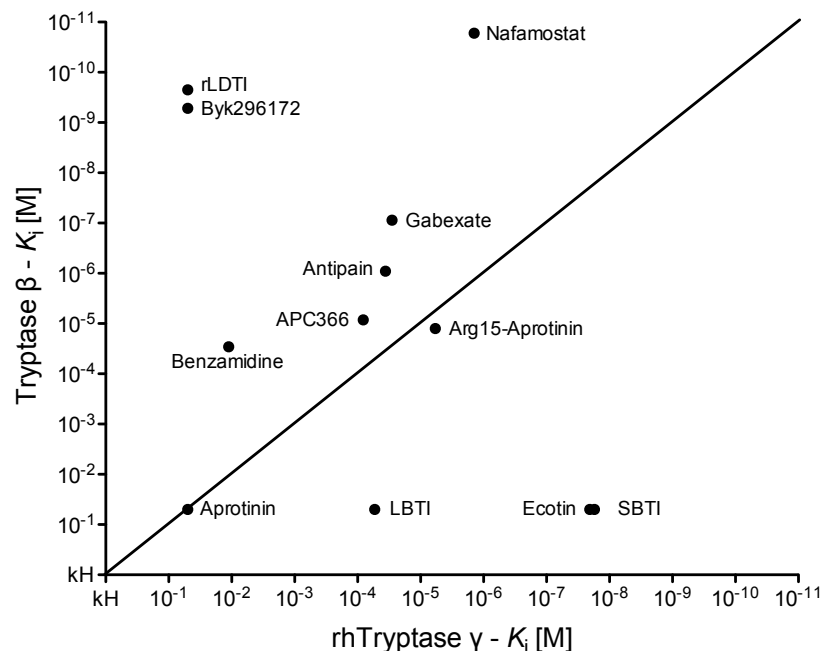


Abb. 6.4-1: Vergleich der Dissoziationskonstanten K_i verschiedener Inhibitoren gegenüber den beiden Tryptasen. Die K_i -Werte sind logarithmisch in inverser Skalierung und damit steigender Affinität zueinander aufgetragen.

6.4.3 Charakterisierung von Antikörpern und ELISAs

Die Verfügbarkeit von spezifischen und hoch affinen Antikörpern ist eine wesentliche Voraussetzung für viele in der biomedizinischen Forschung angewandte Verfahren. Insbesondere sind Antikörper auch für Untersuchungen der Tryptase-Familie notwendig, da zwei der vier Mitglieder (α , δ) enzymatisch inaktiv sind und nicht mittels aktivitätsbasierter Assays nachgewiesen werden können [30, 96]. Die rekombinanten Tryptasen wurden daher verwendet, um kommerzielle und in der Arbeitsgruppe hergestellte Antikörper hinsichtlich Affinität und Spezifität zu charakterisieren. Mittels ELISA und Immunblot wurden spezifische Antikörper für die Tryptasen α/β identifiziert (AA1, H9), die jedoch nicht zwischen ihnen

diskriminieren. Außerdem wurden monospezifische Antikörper für rhTryptase γ und Tryptase δ identifiziert (MAB1667, AF1667 bzw. TPSD1; Tab. 6.4-1). Darüber hinaus detektieren einige Antikörper mehr als eine Tryptase wie z. B. die polyklonalen Antikörper KII und sTE1, die drei Tryptasen α , β und δ und mit geringerer Affinität die rhTryptase γ erkennen, was der > 80 %-igen Sequenzidentität entspricht. Auffallend ist, dass der monoklonale Antikörper MAB1222/G3 auch rhTryptase γ detektiert, obwohl er als für Tryptase α und β spezifisch beschrieben wurde [205]. Dieser Antikörper wurde in einer Reihe von Studien zur Detektion und Charakterisierung der biologischen Funktion von Tryptase α/β z. B. bei systemischer Mastozytose [206, 207], akuter myeloischer Leukämie [208] sowie Mastzell-Sarkomen [209] verwendet. Da dieser Antikörper die rhTryptase γ mit ähnlicher Affinität bindet, sind diese Studien nicht eindeutig, sondern liefern potenziell auch Hinweise auf die biologische Funktion der Tryptase γ .

Tab. 6.4-1: Charakterisierung der Spezifität von „Tryptase-Antikörpern“. Das + symbolisiert eine positive Reaktion im indirekten ELISAs (s. Abb. 4.6-1).

Antikörper	Spezies	Immunogen	Detektion von Tryptase			
			α	β	γ	δ
AA1	Maus	aufgereinigte hu Lungen-Tryptase	+	+	-	-
H9	Maus	Tryptase α 1 – 275 aa	+	+	-	-
MAB1667	Ratte	rek. hu Tryptase γ 20-281 aa	-	-	+	-
AF1667	Ziege	rek. hu Tryptase γ 20-281 aa	-	-	+	-
TPSD1	Kaninchen	Peptid des C-Terminus 164-193 aa	-	-	-	+
sTE1	Schaf	rek. hu Tryptase β	+	+	(+)	+
KII	Kaninchen	rek. hu Tryptase β	+	+	-	+
MAB1222/G3	Maus	aufgereinigte hu Lungen-Tryptase	+	+	+	-

Die rekombinanten Tryptasen wurden außerdem zur Charakterisierung kommerzieller Immunassays verwendet (Tab. 6.4-2). Der klinisch-diagnostisch genutzte, fluoreszenz-basierte *ImmunoCAP Tryptase* (FEIA), der laut Herstellerangaben die humanen Tryptasen α und β im Bereich von 1 - 200 ng/ml detektiert, zeigte eine Wiederfindungsrate von > 95 % gegenüber den rekombinanten Tryptasen α und β . Die Tryptasen γ und δ wurden in diesem Assay dagegen nicht detektiert, was die Spezifität des Assays verifiziert. Dagegen detektieren die Sandwich-ELISAs SEB070Hu, E93781Hu, CSB-E09012h, die zur Detektion der Tryptasen für Forschungszwecke vertrieben werden, keine der rekombinanten Tryptasen auch in bis zu 1000-fach über den Detektionsbereich liegenden Konzentrationen. Diese

fehlende Detektion kann in der Glykosylierung und Faltung der Proteine begründet sein. Wenn Antikörper gegen in *E. coli* hergestellte Antigene gerichtet sind, kann die Detektion glykosylierter und gefalteter Proteine limitiert sein [210]. Aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen wie Glykosylierung und Disulfidbrückenbildung während der Expression in *E. coli* können Antikörper gegen diese Antigene eine geringere Reaktivität zeigen bzw. können ihnen konformationelle Epitope fehlen [211-213]. Auch nach Rücksprache mit den Herstellern wurden Informationen über die verwendeten Antigene bzw. Antikörper leider nicht offengelegt. In jedem Fall scheinen diese Sandwich-ELISAs für die Detektion der Tryptasen nicht geeignet.

Tab. 6.4-2: Vergleich der Spezifitäten verschiedener ELISAs gegenüber der Tryptasefamilie. Die rekombinanten Tryptasen wurden in Konzentrationen der Referenzwerte eingesetzt und die ELISAs nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Analysen zeigten lediglich die Detektion der Tryptasen α und β mittels ImmunoCAP und der Tryptase γ im selbst generierten Tryptase γ -ELISA. Die anderen Assays zeigten keine Detektion.

Kit	Methode	Zielprotein	Identifizierung der Tryptase			
			α	β	γ /Zymogen	δ
ImmunoCAP, Phadia	FEIA	Tryptase $\alpha + \beta$	+	+	-	-
SEB070Hu, USCN	Sandwich-ELISA	Tryptase (TPS)	-	-	-	-
E10501H, USCN	Sandwich-ELISA	Tryptase γ (TPSG1)	-	-	-	-
CSB-E09012h, Cusabio	Sandwich-ELISA	Tryptase γ (TPSG1)	-	-	-	-

6.4.4 Generierung eines anti-Tryptase γ -Antikörpers und eines Sandwich-ELISAs

Um einen spezifischen polyklonalen anti-rhTryptase γ -Antikörper zu generieren, wurden Kaninchen mit rhTryptase γ immunisiert. Die nach 35 Tagen gewonnenen Seren zeigten im indirekten ELISA zu rhTryptase γ und β ähnliche Antikörper-Titer (s. Abb. 5.7-2). Es gelang jedoch, die Kreuzreaktivität mit Hilfe positiver sowie negativer Affinitätschromatographie um den Faktor 1000 stark zu reduzieren (s. Tab. 5.7-1). Damit wurde ein für die rhTryptase γ spezifischer Antikörper (TGIV) generiert (s. Abb. 5.7-5), der im Vergleich zu den kommerziellen anti-Tryptase γ -Antikörpern die höchste Affinität gegenüber rhTryptase γ zeigt (s. Abb. 5.8-1). Aufgrund der Immunisierung mit rhTryptase γ sollte dieser Antikörper sowohl die lösliche als auch die membranverankerte Form der Tryptase γ detektieren. Die Spezifität dieses Antikörpers und die Detektion membranverankerter Tryptase γ wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe an der Mastzelllinie HMC-1 mittels Immunhistologie bestätigt (Dissertation in Vorbereitung, L. Fratila [214]).

Mit Hilfe der rekombinanten Tryptase γ und des hergestellten Antikörpers wurde ein Sandwich-ELISA zum Nachweis von Tryptase γ in biologischen Flüssigkeiten entwickelt. Dieser ELISA ist selektiv für rhTryptase γ (und das Zymogen) und detektiert verwandte Tryptasen sowie Trypsin selbst in 2.000 - 10.000-fach höheren Konzentrationen nicht (s. Abb. 5.8-5). Die Between-Day Präzision der Standardkurve (10 % VK) und die Wiederfindungsrate der rhTryptase γ im Serum (1:10 Verdünnung, > 90 %) sind im zu erwartenden Bereich eines ELISAs und auch für die klinische Diagnostik akzeptabel (s. Abb. 5.8-6). Der Assay erlaubt die Detektion von 2 ng/ml rhTryptase γ und 1,2 ng/ml Tryptase γ -Zymogen (s. Abb. 5.8-4, Abb. 5.8-5), der Detektionsbereich entspricht damit dem des *ImmunoCAP*-Assays für Tryptase α/β (1 - 200 ng/ml; Fa. Phadia). Erste Messungen haben ergeben, dass die Konzentration der Tryptase γ im Serum gesunder Probanden unterhalb des Detektionsbereichs (< 2 ng/ml) liegen und damit niedriger als die der Tryptase β sind (3,8 ng/ml). Dieses Ergebnis bestätigt die deutlich geringere Expression der Tryptase γ im Vergleich zur Tryptase β , die in einer parallelen Arbeit mittels qPCR bestimmt wurden [215]. Allerdings hat die systematische Analyse auf Proteinebene im Rahmen des „Human Protein Atlas“-Programms ein erstaunlich hohes Expressionslevel der Tryptase γ im Vergleich zur Tryptase β in Gewebeproben des Gastrointestinaltrakts gezeigt [94]. Deshalb wäre es interessant Tryptase γ in verschiedenen humanen Gewebeproben unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen und insbesondere bei Magen-Darm-Erkrankungen mit Hilfe des Sandwich-ELISAs zu quantifizieren.

7 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen weitgehend den experimentellen Ansatz. Mittels Mutagenese und rekombinanter Expression in Hefe konnten erstmals ausreichende Mengen einer löslichen, enzymatisch aktiven Variante der Tryptase γ (rhTryptase γ) hergestellt werden, die die funktionelle und strukturelle Charakterisierung im Vergleich zur Tryptase β ermöglichen. Darüber hinaus steht durch die Expression des Tryptase γ -Zymogens und dessen Aktivierung durch Trypsin auch eine native Variante der Tryptase γ zur Verfügung, die zur Validierung eingesetzt werden kann. Bei der Aktivierung im präparativen Maßstab kann die Kontamination mit Trypsin ggf. durch Verwendung von immobilisiertem Trypsin reduziert werden.

Durch die Optimierung der Sauerstoffregelung und den Einsatz einer optischen Sauerstoffsonde im Bioreaktor gelang es, die Ausbeuten der präparativen Fermentation weiter zu steigern (s. 6.1.3). Damit stehen nun große Mengen an rhTryptase γ für die Kristallographie zur Verfügung. Die Aufklärung der Tertiärstruktur wird letztendlich viele der geplanten Vorhaben wie die Entwicklung von Substraten und Inhibitoren wesentlich erleichtern.

Für den Nachweis der enzymatisch aktiven Tryptase γ *in vitro* und *in vivo* wurden fluorogene Peptidsubstrate entwickelt, die im Vergleich zu bisher verfügbaren Substraten deutlich selektiver für rhTryptase γ sind. Die Sensitivität der aktivitätsbasierten Assays ist jedoch für die Detektion in Geweben mit niedrigem Expressionslevel noch nicht ausreichend. Daher sollen andere Substituenten insbesondere an P2 und P3 verwendet werden, um die katalytische Effizienz zu steigern.

Das Screening von fast 1000 Inhibitoren führte überraschenderweise nicht zur Identifizierung eines natürlich vorkommenden oder synthetischen Hemmstoffes, der als *lead compound* für die biotechnologische bzw. synthetische Weiterentwicklung dienen könnte. Deshalb ist zunächst die Synthese von *affinity-based probes* bzw. substratanalogen Inhibitoren basierend auf der erweiterten Substratspezifität geplant, bis die Kristallstruktur für die strukturbasierte Inhibitorenentwicklung zur Verfügung steht.

Ein weiteres überraschendes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass sowohl der am weitesten, bis in die klinische Phase II entwickelte synthetische 'Tryptase β -Inhibitor', APC-366, als auch ein klassischer 'Tryptase β -Antikörper', MAB1222/G3, nicht zwischen den Tryptasen β und γ diskriminieren. Studien, in denen diese Substanzen zur Untersuchung der (patho)physiologischen Funktionen der Tryptase β eingesetzt worden sind, müssen daher kritisch hinter-

fragt werden. Dazu sollen die in dieser Arbeit entwickelten aktivitätsbasierten und immunologischen Assays genutzt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen uns zu der These, dass Tryptase γ an (patho)physiologischen Funktionen der Mastzelle beteiligt ist, die bisher Tryptase β zugeschrieben wurden. Diese wird auch dadurch gestützt, dass monomere Tryptase β das Tryptase γ -Zymogen aktiviert. Diese Aktivierungskaskade, die in Mastzell-Granula ablaufen kann, soll durch Tryptase β -*Silencing* z. B. an Mastzelllinien verifiziert werden. Die Bestätigung der Aktivierungskaskade hat die Konsequenz, dass die bisherigen *knockout*-Studien in Mäusen zur Funktion der murinen Tryptasen MMCP-6 und -7 nicht eindeutig sind, da der *knockout* konsekutiv zum Verlust der Aktivierung und Aktivität der murinen Tryptase γ führt.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die beiden enzymatisch aktiven Vertreter der Tryptase-Familie, β und γ , überlappende, aber z. T. auch divergierende und komplementäre Eigenschaften haben und vermutlich in einer Aktivierungskaskade zusammenarbeiten. Die Verfügbarkeit beider Tryptasen ist eine gute Basis, um selektive Assays und Inhibitoren weiter zu entwickeln und die komplexen Interaktionen bei Mastzell-vermittelten Prozessen in Physiologie und Pathophysiologie aufzuklären. Es bleibt abzuwarten, ob dabei auch die Entwicklung von Tryptase-Inhibitoren für klinische Anwendungen re-evaluiert werden muss, die seit den wenig aussagekräftigen Phase II-Studien von APC-366 stagniert.

8 Literaturverzeichnis

1. Beaven MA (2009) Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *European journal of immunology* 39(1):11-25.
2. Ehrlich P (1878) Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. (Universität Leipzig, Leipzig).
3. Ehrlich P (1879) Beiträge zur Kenntniss der granulirten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. in *Verhandlungen der Berliner physiologischen Gesellschaft* (Archiv fuer Anatomie und Physiologie: Physiologische Abteilung), pp 166-169.
4. Schulte R (2012) Mikroskopie-Forum; Histologie.
5. Dvorak HF (2005) Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 3(8):1835-1842.
6. Abraham SN & St John AL (2010) Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature reviews. Immunology* 10(6):440-452.
7. Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, & Arock M (2002) The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends in immunology* 23(3):151-158.
8. Craig SS & Schwartz LB (1990) Human Mctc Type of Mast-Cell Granule - the Uncommon Occurrence of Discrete Scrolls Associated with Focal Absence of Chymase. *Laboratory Investigation* 63(4):581-585.
9. Algermissen B, Bauer F, Schadendorf D, Kropp JD, & Czarnetzki BM (1994) Analysis of mast cell subpopulations (MCT, MCTC) in cutaneous inflammation using novel enzyme-histochemical staining techniques. *Exp Dermatol* 3(6):290-297.
10. Bischoff SC (2007) Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature reviews. Immunology* 7(2):93-104.
11. Voehringer D (2013) Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature reviews. Immunology* 13(5):362-375.
12. Bradding P, Walls AF, & Holgate ST (2006) The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 117(6):1277-1284.
13. Galli SJ, Nakae S, & Tsai M (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* 6(2):135-142.
14. Vitte J (2014) Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Molecular immunology*.
15. Gilfillan AM & Tkaczyk C (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunology* 6(3):218-230.
16. Urb M & Sheppard DC (2012) The role of mast cells in the defence against pathogens. *PLoS pathogens* 8(4):e1002619.
17. Boyce JA (2003) Mast cells: beyond IgE. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111(1):24-32; quiz 33.
18. Kurashima Y & Kiyono H (2014) New era for mucosal mast cells: their roles in inflammation, allergic immune responses and adjuvant development. *Experimental & molecular medicine* 46:e83.
19. Sommerhoff CP (2001) Mast cell tryptases and airway remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine* 164(10 Pt 2):S52-58.
20. Pejler G, Ronnberg E, Waern I, & Wernersson S (2010) Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 115(24):4981-4990.
21. Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, & Kalogeromitros D (2007) Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunological reviews* 217:65-78.
22. Sommerhoff CP & Schaschke N (2007) Mast cell tryptase beta as a target in allergic inflammation: an evolving story. *Current pharmaceutical design* 13(3):313-332.

23. Pallaoro M, Fejzo MS, Shayesteh L, Blount JL, & Caughey GH (1999) Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *The Journal of biological chemistry* 274(6):3355-3362.
24. Wong GW, et al. (1999) Identification of a new member of the tryptase family of mouse and human mast cell proteases which possesses a novel COOH-terminal hydrophobic extension. *The Journal of biological chemistry* 274(43):30784-30793.
25. Caughey GH, et al. (2000) Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostasin gene families. *Journal of immunology* 164(12):6566-6575.
26. Yuan J, et al. (2006) Expression and characterization of recombinant gamma-tryptase. *Protein Express Purif* 49(1):47-54.
27. Schwartz LB, Irani AMA, Roller K, Castells MC, & Schechter NM (1987) Quantitation of Histamine, Tryptase, and Chymase in Dispersed Human T-Mast and Tc-Mast Cells. *Journal of immunology* 138(8):2611-2615.
28. Xia HZ, et al. (1995) Quantitation of tryptase, chymase, Fc epsilon RI alpha, and Fc epsilon RI gamma mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of immunology* 154(10):5472-5480.
29. Vanderslice P, et al. (1990) Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family. *P Natl Acad Sci USA* 87(10):3811-3815.
30. Marquardt U, Zettl F, Huber R, Bode W, & Sommerhoff C (2002) The crystal structure of human alpha1-tryptase reveals a blocked substrate-binding region. *Journal of molecular biology* 321(3):491-502.
31. Huang C, et al. (1999) Human tryptases alpha and beta/II are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft. *The Journal of biological chemistry* 274(28):19670-19676.
32. Trivedi NN, Tamraz B, Chu C, Kwok PY, & Caughey GH (2009) Human subjects are protected from mast cell tryptase deficiency despite frequent inheritance of loss-of-function mutations. *The Journal of allergy and clinical immunology* 124(5):1099-1105 e1091-1094.
33. Soto D, Malmsten C, Blount JL, Muilenburg DJ, & Caughey GH (2002) Genetic deficiency of human mast cell alpha-tryptase. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 32(7):1000-1006.
34. Akin C, et al. (2007) Tryptase haplotype in mastocytosis: relationship to disease variant and diagnostic utility of total tryptase levels. *Clin Immunol* 123(3):268-271.
35. Zettl F (2002) Klonierung, rekombinante Herstellung und Charakterisierung von humanen Mastzell-Tryptasen. Dissertation (Technische Universität München, München).
36. Harris JL, et al. (2001) Definition of the extended substrate specificity determinants for beta-tryptases I and II. *The Journal of biological chemistry* 276(37):34941-34947.
37. Sakai K, Ren S, & Schwartz LB (1996) A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I. *The Journal of clinical investigation* 97(4):988-995.
38. Le QT, et al. (2011) Promiscuous Processing of Human alpha/beta-Protryptases by Cathepsins L, B, and C. *Journal of immunology* 186(12):7136-7143.
39. Lindstedt KA, Kokkonen JO, & Kovanen PT (1998) Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1425(3):617-627.
40. Payne V & Kam PCA (2004) Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 59(7):695-703.
41. Pereira PJ, et al. (1998) Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* 392(6673):306-311.
42. Sommerhoff CP, et al. (1999) The structure of the human beta11-tryptase tetramer: fo(u)r better or worse. *P Natl Acad Sci USA* 96(20):10984-10991.
43. Fukuoka Y & Schwartz LB (2007) Active monomers of human beta-tryptase have expanded substrate specificities. *International immunopharmacology* 7(14):1900-1908.

44. Fajardo I & Pejler G (2003) Formation of active monomers from tetrameric human beta-tryptase. *The Biochemical journal* 369(Pt 3):603-610.
45. Sommerhoff CP, Bode W, Matschiner G, Bergner A, & Fritz H (2000) The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2):75-89.
46. Sommerhoff CP, *et al.* (1994) A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 375(10):685-694.
47. Hallgren J, Lindahl S, & Pejler G (2005) Structural requirements and mechanism for heparin-dependent activation and tetramerization of human beta- and betaII-tryptase. *Journal of molecular biology* 345(1):129-139.
48. Strik MCM, *et al.* (2004) Intracellular serpin SERPINB6 (PI6) is abundantly expressed by human mast cells and forms complexes with beta-tryptase monomers. *Blood* 103(7):2710-2717.
49. Tam EK, Franconi GM, Nadel JA, & Caughey GH (1990) Protease inhibitors potentiate smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in isolated human bronchi. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2(5):449-452.
50. Hallgren J & Pejler G (2006) Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *The FEBS journal* 273(9):1871-1895.
51. Stack MS & Johnson DA (1994) Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). *The Journal of biological chemistry* 269(13):9416-9419.
52. Gruber BL, *et al.* (1989) Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *The Journal of clinical investigation* 84(5):1657-1662.
53. Fajardo I & Pejler G (2003) Human mast cell beta-tryptase is a gelatinase. *Journal of immunology* 171(3):1493-1499.
54. Lohi J, Harvima I, & Keski-Oja J (1992) Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem* 50(4):337-349.
55. Thomas VA, Wheelless CJ, Stack MS, & Johnson DA (1998) Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption. *Biochemistry-Us* 37(8):2291-2298.
56. Prieto-Garcia A, *et al.* (2012) Mast cell restricted mouse and human tryptase.heparin complexes hinder thrombin-induced coagulation of plasma and the generation of fibrin by proteolytically destroying fibrinogen. *The Journal of biological chemistry* 287(11):7834-7844.
57. Prieto-Garcia A, Castells MC, & Stevens RL (2014) Mast Cell-Derived hTryptase-beta Functions as a Potent Anticoagulant by Proteolytically Damaging Fibrinogen. *J Invest Allerg Clin* 24(4):286-287.
58. Maier M, Spragg J, & Schwartz LB (1983) Inactivation of human high molecular weight kininogen by human mast cell tryptase. *Journal of immunology* 130(5):2352-2356.
59. Little SS & Johnson DA (1995) Human Mast-Cell Tryptase Isoforms - Separation and Examination of Substrate-Specificity Differences. *Biochemical Journal* 307:341-346.
60. Prieto-Garcia A, Castells MC, Hansbro PM, & Stevens RL (2014) Mast Cell-Restricted Tetramer-Forming Tryptases and Their Beneficial Roles in Hemostasis and Blood Coagulation. *Immunol Allergy Clin* 34(2):263-+.
61. Kozik A, *et al.* (1998) A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites - Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. *Journal of Biological Chemistry* 273(50):33224-33229.
62. Imamura T, Dubin A, Moore W, Tanaka R, & Travis J (1996) Induction of vascular permeability enhancement by human tryptase: Dependence on activation of prekallikrein and direct release of Bradykinin from kininogens. *Laboratory Investigation* 74(5):861-870.
63. Molino M, *et al.* (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *Thromb Haemostasis*:Ps259-Ps259.

64. Cottrell GS, Amadesi S, Schmidlin F, & Bunnett N (2003) Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function. *Biochemical Society transactions* 31(Pt 6):1191-1197.
65. Caughey GH (2007) Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. *Immunological reviews* 217:141-154.
66. Allard B, et al. (2014) Protease Activated Receptor-2 Expression and Function in Asthmatic Bronchial Smooth Muscle. *PloS one* 9(2).
67. Caughey GH (2016) Mast cell proteases as pharmacological targets. *Eur J Pharmacol* 778:44-55.
68. Krishna MT, et al. (2001) Inhibition of mast cell tryptase by inhaled APC 366 attenuates allergen-induced late-phase airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immun* 107(6):1039-1045.
69. Erin EM, et al. (2006) Effects of a reversible beta-tryptase and trypsin inhibitor (RWJ-58643) on nasal allergic responses. *Clinical and Experimental Allergy* 36(4):458-464.
70. Tremaine WJ, et al. (2002) Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (APC 2059): an open-label pilot study. *Aliment Pharm Therap* 16(3):407-413.
71. Ammendola M, et al. (2014) Targeting mast cells tryptase in tumor microenvironment: a potential antiangiogenetic strategy. *Biomed Res Int* 2014:154702.
72. Radzey H, et al. (2013) E-64c-Hydrazide: A Lead Structure for the Development of Irreversible CathepsinC Inhibitors. *Chemmedchem* 8(8):1314-1321.
73. Thakurdas SM, et al. (2007) The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections. *The Journal of biological chemistry* 282(29):20809-20815.
74. Metz M, et al. (2006) Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* 313(5786):526-530.
75. Sakai K, Long SD, Pettit DA, Cabral GA, & Schwartz LB (1996) Expression and purification of recombinant human tryptase in a baculovirus system. *Protein Express Purif* 7(1):67-73.
76. Schwartz LB, et al. (2003) Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1 cells, Mono-Mac-6 cells, and human skin-derived mast cells. *Journal of immunology* 170(11):5667-5673.
77. Kanthawatana S, et al. (1999) The potential clinical utility of serum alpha-protryptase levels. *The Journal of allergy and clinical immunology* 103(6):1092-1099.
78. Rohr KB, et al. (2006) X-ray structures of free and leupeptin-complexed human alpha I-tryptase mutants: Indication for an alpha ->beta-tryptase transition. *Journal of Molecular Biology* 357(1):195-209.
79. Selwood T, Wang ZM, McCaslin DR, & Schechter NM (2002) Diverse stability and catalytic properties of human tryptase alpha and beta isoforms are mediated by residue differences at the S1 pocket. *Biochemistry-Us* 41(10):3329-3340.
80. Abdelmotelb AM, et al. (2014) Alpha-tryptase gene variation is associated with levels of circulating IgE and lung function in asthma. *Clin Exp Allergy* 44(6):822-830.
81. Velasquez CV, et al. (2015) Alpha tryptase allele of Tryptase 1 (TPSAB1) gene associated with Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) and Dengue Shock Syndrome (DSS) in Vietnam and Philippines. *Human Immunology* 76(5):318-323.
82. Trivedi NN, Raymond WW, & Caughey GH (2008) Chimerism, point mutation, and truncation dramatically transformed mast cell delta-tryptases during primate evolution. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121(5):1262-1268.
83. Min HK, Kambe N, & Schwartz LB (2001) Human mouse mast cell protease 7-like tryptase genes are pseudogenes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 107(2):315-321.
84. Wang HW, et al. (2002) Delta tryptase is expressed in multiple human tissues, and a recombinant form has proteolytic activity. *Journal of immunology* 169(9):5145-5152.
85. Trivedi NN, Tong Q, Raman K, Bhagwandin VJ, & Caughey GH (2007) Mast cell alpha and beta tryptases changed rapidly during primate speciation and evolved from

- gamma-like transmembrane peptidases in ancestral vertebrates. *Journal of immunology* 179(9):6072-6079.
86. Reimer JM, Samollow PB, & Hellman L (2010) High degree of conservation of the multigene tryptase locus over the past 150-200 million years of mammalian evolution. *Immunogenetics* 62(6):369-382.
 87. Caughey GH (2006) A Pulmonary Perspective on GASPIDs: Granule-Associated Serine Peptidases of Immune Defense. *Current respiratory medicine reviews* 2(39):263-277.
 88. Wong GW, *et al.* (2002) Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase gamma. TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 277(44):41906-41915.
 89. Neil D, Salvesen, G. (2013) *Handbook of proteolytic enzymes (3rd edition)* (Academic Press, Elsevier Ltd.).
 90. Szabo R & Bugge TH (2011) Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annual review of cell and developmental biology* 27:213-235.
 91. Aggarwal S, Dabla PK, & Arora S (2013) Prostatin: An Epithelial Sodium Channel Regulator. *J Biomark* 2013:179864.
 92. Tang T, *et al.* (2005) Testisin, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked serine protease, promotes malignant transformation in vitro and in vivo. *Cancer research* 65(3):868-878.
 93. Verghese GM, Gutknecht MF, & Caughey GH (2006) Prostatin regulates epithelial monolayer function: cell-specific Gpld1-mediated secretion and functional role for GPI anchor. *American journal of physiology. Cell physiology* 291(6):C1258-1270.
 94. Uhlen M, *et al.* (2015) Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347(6220):394-+.
 95. Hansbro PM, *et al.* (2014) Importance of Mast Cell Prss31/Transmembrane Tryptase/Tryptase-gamma in Lung Function and Experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Colitis. *Journal of Biological Chemistry* 289(26):18214-18227.
 96. Sauer U (2011) Klonierung und rekombinante Herstellung humaner Mastzell-Tryptasen. Dissertation (Ludwig-Maximilians-Universität München, München).
 97. Louis-Jeune C, Andrade-Navarro MA, & Perez-Iratxeta C (2012) Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra (vol 80, pg 374, 2012). *Proteins* 80(12):2818-2818.
 98. Perez-Iratxeta C & Andrade-Navarro MA (2008) K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bmc Struct Biol* 8.
 99. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, & Bateman A (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 42(D1):D503-D509.
 100. Berman HM, *et al.* (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28(1):235-242.
 101. Morrison JF (1969) Kinetics of Reversible Inhibition of Enzyme-Catalysed Reactions by Tight-Binding Inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 185(2):269-&.
 102. Kuzmic P, Hill C, Kirtley MP, & Janc JW (2003) Kinetic determination of tight-binding impurities in enzyme inhibitors. *Anal Biochem* 319(2):272-279.
 103. Biasini M, *et al.* (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* 42(W1):W252-W258.
 104. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, & Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2):195-201.
 105. Bordoli L, *et al.* (2009) Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc* 4(1):1-13.
 106. Guex N, Peitsch MC, & Schwede T (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30:S162-S173.

107. Alter SC, Metcalfe DD, Bradford TR, & Schwartz LB (1987) Regulation of human mast cell tryptase. Effects of enzyme concentration, ionic strength and the structure and negative charge density of polysaccharides. *The Biochemical journal* 248(3):821-827.
108. Schechter NM, Eng GY, & Mccaslin DR (1993) Human Skin Tryptase - Kinetic Characterization of Its Spontaneous Inactivation. *Biochemistry-Us* 32(10):2617-2625.
109. Alter SC & Schwartz LB (1989) Effect of histamine and divalent cations on the activity and stability of tryptase from human mast cells. *Biochim Biophys Acta* 991(3):426-430.
110. Shipway A, *et al.* (2004) Biochemical characterization of prostasin, a channel activating protease. *Biochem Bioph Res Co* 324(2):953-963.
111. Popko J, *et al.* (2003) Lead, cadmium, copper and zinc concentrations in blood and hair of mothers of children with locomotor system malformations. *Pol J Environ Stud* 12(3):375-379.
112. Jansen J, *et al.* (2012) Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. *J Nutr Biochem* 23(11):1458-1466.
113. Tam EK & Caughey GH (1990) Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 3(1):27-32.
114. Lu J, Chen BA, Li SL, & Sun Q (2014) Tryptase inhibitor APC 366 prevents hepatic fibrosis by inhibiting collagen synthesis induced by tryptase/protease-activated receptor 2 interactions in hepatic stellate cells. *International Immunopharmacology* 20(2):352-357.
115. He SH, Chen P, & Chen HQ (2003) Modulation of enzymatic activity of human mast cell tryptase and chymase by protease inhibitors. *Acta Pharmacol Sin* 24(9):923-929.
116. Bahlmann A, Carvalho JJ, Weller MG, Panne U, & Schneider RJ (2012) Immunoassays as high-throughput tools: Monitoring spatial and temporal variations of carbamazepine, caffeine and cetirizine in surface and wastewaters. *Chemosphere* 89(11):1278-1286.
117. Eidem JK, *et al.* (2006) Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquat Toxicol* 78(2):202-206.
118. R&D Systems I (2014) Spike, Recovery and Linearity - Protocol for Validating Untested Samples in R&D Systems ELISAs.
119. International A (2012) Guidelines for Standard Method Performance Requirements. (AOAC International, Rockville, MD, USA).
120. Group IEW (2005) Validation of Analytical procedures: text and methodology Q2(R1). in *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*.
121. Thompson M. WR (1995) Harmonized Guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. *Pure & Appl. Chem* 67(4):649-666.
122. Suchowski K (2011) Rekombinante Herstellung der Tryptase gamma in Escherichia coli. (Ludwig-Maximilians-Universität München).
123. Vasquez JR, Evnin LB, Higaki JN, & Craik CS (1989) An Expression System for Trypsin. *J Cell Biochem* 39(3):265-276.
124. Voza LA, *et al.* (1996) Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio-Technol* 14(1):77-81.
125. White JF, Trinh LB, Shiloach J, & Grisshammer R (2004) Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin. *Febs Letters* 564(3):289-293.
126. Sugiki T, Fujiwara T, & Kojima C (2014) Latest approaches for efficient protein production in drug discovery. *Expert Opin Drug Dis* 9(10):1189-1204.
127. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, & Higgins DR (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16(1):23-52.
128. Dean N (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta* 1426(2):309-322.
129. Laßleben T (2002) Identifizierung und prozessive Spaltung von Substraten der humanen Mastzell-Tryptase. Dissertation (Ludwig-Maximilians-Universität München, München).

130. Niles AL, Maffitt M, Haak-Frendscho M, Wheelless CJ, & Johnson DA (1998) Recombinant human mast cell tryptase: stable expression in *Pichia pastoris* and purification of fully active enzyme. *Biotechnol Appl Bioc* 28:125-131.
131. Mochida S, Tsuzuki S, Yasumoto M, Inouye K, & Fushiki T (2009) Secreted expression of pseudozymogen forms of recombinant matriptase in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Tech* 45(4):288-294.
132. Shih YP, Wu HC, Hu SM, Wang TF, & Wang AH (2005) Self-cleavage of fusion protein in vivo using TEV protease to yield native protein. *Protein Sci* 14(4):936-941.
133. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, & Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22(4):249-270.
134. Sinha J, Plantz BA, Inan M, & Meagher MM (2005) Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnol Bioeng* 89(1):102-112.
135. Krainer FW, *et al.* (2012) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact* 11:22.
136. Gleeson MA, White CE, Meininger DP, & Komives EA (1998) Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Methods Mol Biol* 103:81-94.
137. Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, & Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13(4):329-332.
138. Kobayashi K, *et al.* (2000) High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng* 89(1):55-61.
139. White CE, Kempf NM, & Komives EA (1994) Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure* 2(11):1003-1005.
140. Romanos M (1995) Advances in the Use of *Pichia-Pastoris* for High-Level Gene-Expression. *Curr Opin Biotech* 6(5):527-533.
141. Sarraemagna V, Demange P, Milon A, & Talmont F (2002) Optimizing functional versus total expression of the human mu-opioid receptor in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 24(2):212-220.
142. Brierley RA (1998) Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods Mol Biol* 103:149-177.
143. Cereghino JL & Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24(1):45-66.
144. Anspach FB, *et al.* (1989) High-Performance Liquid Affinity-Chromatography with Phenylboronic Acid, Benzamidine, Tri-L-Alanine, and Concanavalin-a Immobilized on 3-Isothiocyanatopropyltriethoxysilane-Activated Nonporous Monodisperse Silicas. *Anal Biochem* 179(1):171-181.
145. Yang S, *et al.* (2013) Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. *PloS one* 8(9):e75347.
146. Ghosalkar A, Sahai V, & Srivastava A (2008) Secretory expression of interferon-alpha 2b in recombinant *Pichia pastoris* using three different secretion signals. *Protein Expr Purif* 60(2):103-109.
147. Kornfeld R & Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54:631-664.
148. Ballou CE (1990) Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol* 185:440-470.
149. Yip CL, *et al.* (1994) Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7):2723-2727.
150. Vervecken W, *et al.* (2004) In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Applied and environmental microbiology* 70(5):2639-2646.

151. Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R, & Callewaert N (2009) Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat Protoc* 4(1):58-70.
152. Fasman GD, Foster RJ, & Beychok S (1966) Conformational Transition Associated with Activation of Chymotrypsinogen to Chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology* 19(2):240-&.
153. Sasaki T, Kobayashi M, & Kise H (1997) Active conformation of alpha-chymotrypsin in organic solvents as studied by circular dichroism. *Biotechnol Tech* 11(6):387-390.
154. Kerr MA, Walsh KA, & Neurath H (1975) Catalysis by Serine Proteases and Their Zymogens - Study of Acyl Intermediates by Circular-Dichroism. *Faseb J* 34(3):483-483.
155. Matsuo K, Sakurada Y, Yonehara R, Kataoka M, & Gekko K (2007) Secondary-structure analysis of denatured proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *Biophys J* 92(11):4088-4096.
156. Vallejo JA, Ageitos JM, Poza M, & Villa TG (2008) Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(22):10606-10610.
157. Hanquier J, et al. (2003) A single mutation in the activation site of bovine trypsinogen enhances its accumulation in the fermentation broth of the yeast *Pichia pastoris*. *Applied and environmental microbiology* 69(2):1108-1113.
158. Lawson C, et al. (2002) Purification and characterization of recombinant rat mast cell protease 7 expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif* 25(2):256-262.
159. Prestrelski SJ, Byler DM, & Liebman MN (1991) Comparison of Various Molecular-Forms of Bovine Trypsin - Correlation of Infrared-Spectra with X-Ray Crystal-Structures. *Biochemistry-Us* 30(1):133-143.
160. Khan AR & James MNG (1998) Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci* 7(4):815-836.
161. Le QT, et al. (2011) Processing of human protryptase in mast cells involves cathepsins L, B, and C. *Journal of immunology* 187(4):1912-1918.
162. Fukuoka Y & Schwartz LB (2004) Human beta-tryptase: detection and characterization of the active monomer and prevention of tetramer reconstitution by protease inhibitors. *Biochemistry-Us* 43(33):10757-10764.
163. Skala W, et al. (2014) Structure-Function Analyses of Human Kallikrein-related Peptidase 2 Establish the 99-Loop as Master Regulator of Activity. *Journal of Biological Chemistry* 289(49):34267-34283.
164. Debela M, et al. (2008) Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7. *Biol Chem* 389(6):623-632.
165. Goettig P, Magdolen V, & Brandstetter H (2010) Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* 92(11):1546-1567.
166. Rickert KW, et al. (2008) Structure of Human Prostasin, a Target for the Regulation of Hypertension. *Journal of Biological Chemistry* 283(50):34864-34872.
167. Remacle AG, et al. (2008) Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *The Journal of biological chemistry* 283(30):20897-20906.
168. Prox J, Arnold P, & Becker-Pauly C (2015) Meprin alpha and meprin beta: Procollagen proteinases in health and disease. *Matrix Biol* 44-46:7-13.
169. Najj AJ, Dyson G, Jena BP, Lin CY, & Kim HC (2015) Matriptase Activation and Shedding through PDGF-D-mediated Extracellular Acidosis. *American journal of physiology. Cell physiology*:ajpcell 00043 02015.
170. Lin CY, et al. (2008) Zymogen activation, inhibition, and ectodomain shedding of matriptase. *Front Biosci* 13:621-635.
171. Schmidt T (2016) Prozessierung und Lokalisierung der Tryptasen gamma und delta in HMC-1 Mastzellen. (Ludwig-Maximilians-Universität, München).
172. Parks SK, Mazure NM, Counillon L, & Pouyssegur J (2013) Hypoxia promotes tumor cell survival in acidic conditions by preserving ATP levels. *J Cell Physiol* 228(9):1854-1862.

173. Annecke T, *et al.* (2011) Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *Br J Anaesth* 107(5):679-686.
174. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, & Dissemond J (2007) Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Arch Dermatol Res* 298(9):413-420.
175. Kato Y, *et al.* (2013) Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int* 13(1):89.
176. Blow DM, Birktoft JJ, & Hartley BS (1969) Role of a Buried Acid Group in Mechanism of Action of Chymotrypsin. *Nature* 221(5178):337-&.
177. Huber R & Bode W (1978) Structural Basis of Activation and Action of Trypsin. *Accounts Chem Res* 11(3):114-122.
178. Di Cera E (2009) Serine proteases. *IUBMB Life* 61(5):510-515.
179. Sichler K, *et al.* (2002) The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Lett* 530(1-3):220-224.
180. Raymond WW, Tam EK, Blount JL, & Caughey GH (1995) Purification and characterization of dog mast cell protease-3, an oligomeric relative of tryptases. *The Journal of biological chemistry* 270(22):13164-13170.
181. Harris JL, *et al.* (2000) Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14):7754-7759.
182. Bode W, *et al.* (1989) The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* 8(11):3467-3475.
183. Gosalia DN, Salisbury CM, Maly DJ, Ellman JA, & Diamond SL (2005) Profiling serine protease substrate specificity with solution phase fluorogenic peptide microarrays. *Proteomics* 5(5):1292-1298.
184. Barre O, *et al.* (2014) Cleavage specificity analysis of six type II transmembrane serine proteases (TTSPs) using PICS with proteome-derived peptide libraries. *PLoS one* 9(9):e105984.
185. Gosalia DN, Salisbury CM, Ellman JA, & Diamond SL (2005) High throughput substrate specificity profiling of serine and cysteine proteases using solution-phase fluorogenic peptide microarrays. *Mol Cell Proteomics* 4(5):626-636.
186. Meldal M, Svendsen I, Breddam K, & Auzanneau FI (1994) Portion-mixing peptide libraries of quenched fluorogenic substrates for complete subsite mapping of endoprotease specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8):3314-3318.
187. Schilling O & Overall CM (2008) Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. *Nat Biotechnol* 26(6):685-694.
188. Kleifeld O, *et al.* (2010) Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat Biotechnol* 28(3):281-288.
189. Kappelhoff R & Overall C (2009) The CLIP-CHIP oligonucleotide microarray: dedicated array for analysis of all protease, nonproteolytic homolog, and inhibitor gene transcripts in human and mouse. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 21:Unit21 19.
190. Raymond WW, Sommerhoff CP, & Caughey GH (2005) Mastin is a gelatinolytic mast cell peptidase resembling a mini-proteasome. *Arch Biochem Biophys* 435(2):311-322.
191. Sanman LE & Bogoy M (2014) Activity-Based Profiling of Proteases. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 83 83:249-273.
192. Turk B (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 5(9):785-799.
193. Fonovic M & Bogoy M (2008) Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases. *Expert Rev Proteomic* 5(5):721-730.
194. Kasperkiewicz P, *et al.* (2015) Design of a Selective Substrate and Activity Based Probe for Human Neutrophil Serine Protease 4. *PLoS one* 10(7).
195. Vickers CJ, Gonzalez-Paez GE, & Wolan DW (2013) Selective detection of caspase-3 versus caspase-7 using activity-based probes with key unnatural amino acids. *ACS Chem Biol* 8(7):1558-1566.

196. Pham W, Choi Y, Weissleder R, & Tung CH (2004) Developing a peptide-based near-infrared molecular probe for protease sensing. *Bioconjug Chem* 15(6):1403-1407.
197. Oleksyszyn J & Powers JC (1991) Irreversible inhibition of serine proteases by peptide derivatives of (alpha-aminoalkyl)phosphonate diphenyl esters. *Biochemistry-US* 30(2):485-493.
198. Pan Z, et al. (2006) Development of activity-based probes for trypsin-family serine proteases. *Bioorg Med Chem Lett* 16(11):2882-2885.
199. Janke D, Sommerhoff CP, & Schaschke N (2011) The arginine mimicking beta-amino acid beta(3)hPhe(3-H(2)N-CH(2)) as S1 ligand in cyclotheonamide-based beta-tryptase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 19(23):7236-7243.
200. Schaschke N & Sommerhoff CP (2010) Upgrading a natural product: inhibition of human beta-tryptase by cyclotheonamide analogues. *ChemMedChem* 5(3):367-370.
201. Pantoja-Uceda D, et al. (2009) Deciphering the structural basis that guides the oxidative folding of leech-derived tryptase inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 284(51):35612-35620.
202. Sommerhoff CP, et al. (2010) Engineered cystine knot miniproteins as potent inhibitors of human mast cell tryptase beta. *Journal of molecular biology* 395(1):167-175.
203. Clark JM, et al. (1995) Tryptase Inhibitors Block Allergen-Induced Airway and Inflammatory Responses in Allergic Sheep. *American journal of respiratory and critical care medicine* 152(6):2076-2083.
204. Numerof RP, Simpson PJ, & Tanaka R (1997) Tryptase inhibitors: a novel class of anti-inflammatory drugs. *Expert opinion on investigational drugs* 6(7):811-817.
205. Schwartz LB, et al. (1995) The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *J Clin Invest* 96(6):2702-2710.
206. Jordan JH, et al. (2001) Immunohistochemical properties of bone marrow mast cells in systemic mastocytosis: Evidence for expression of CD2, CD117/Kit, and bcl-x(L). *Hum Pathol* 32(5):545-552.
207. Horny HP, et al. (1998) Diagnostic value of immunostaining for tryptase in patients with mastocytosis. *American Journal of Surgical Pathology* 22(9):1132-1140.
208. Sperr WR, et al. (2001) Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 98(7):2200-2209.
209. Ryan RJH, et al. (2013) Mast Cell Sarcoma: An Aggressive and Potentially Under-Diagnosed Neoplasm That May Be Responsive to Targeted Therapy. *Modern Pathol* 26:359a-359a.
210. Forsstrom B, et al. (2015) Dissecting Antibodies with Regards to Linear and Conformational Epitopes. *PloS one* 10(3).
211. Sela M, Schechte.B, Schechte.I, & Borek F (1967) Antibodies to Sequential and Conformational Determinants. *Cold Spring Harb Sym* 32:537-&.
212. Niman HL, et al. (1983) Generation of Protein-Reactive Antibodies by Short Peptides Is an Event of High-Frequency - Implications for the Structural Basis of Immune Recognition. *P Natl Acad Sci-Biol* 80(16):4949-4953.
213. Brown MC, et al. (2011) Impact of immunization technology and assay application on antibody performance--a systematic comparative evaluation. *PloS one* 6(12):e28718.
214. Fratila LA (Dissertation in Vorbereitung: RT-qPCR for the Quantification of Human Mast Cell Tryptases. (Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität München, München).
215. Fratila LA (2014) Real Time PCR Quantification of Mast Cell Tryptases in *Congress of Clinical Chemistry and Laboratory (DKLM)*, ed Plebani M (Mannheim), p A137.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maria Theresa Grundhuber
Geburtstag	27.02.1984
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	deutsch

Hochschulausbildung

seit 02/2010	Promotion an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München Betreuer: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt und an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Leitung: Prof. Dr. Marianne Jochum) und am Institut für Laboratoriumsmedizin, LMU, München (Leitung: Prof. Dr. Daniel Teupser) Betreuer: Prof. Dr. Christian Sommerhoff <i>„Biotechnologische Herstellung und Charakterisierung der humanen Mastzell-Tryptase γ“</i>
08/2009 – 01/2010	Praktikum in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie an der LMU, München Betreuer: Prof. Dr. Marianne Jochum
04/2007 – 04/2009	Master of Science im Fach Biochemie an LMU, München Masterarbeit <i>„Der Einfluss des Notch-Signalweges auf die Musterbildung und Stammzelldifferenzierung in Hydra vulgaris“</i> Betreuer: Prof. Dr. Angelika Böttger
10/2003 – 03/2007	Bachelor of Science im Fach Chemie und Biochemie an der LMU, München Bachelorarbeit <i>„Klonierung und Expression von den kleinen Zink-bindenden Proteinen OE3131F und OE2447F aus Halobacterium salinarum“</i> Betreuer: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

Schulbildung

1994 - 2003	Edith-Stein-Gymnasium, München
1990 - 1994	Montessori-Grundschule, Hohenbrunn

Lehrtätigkeit

10/2015	Koorganisation des Workshops „Protease Kinetics“ im Rahmen des 9th General Meeting of the International Proteolysis Society in Penang, Malaysia
10/2013	Betreuung der Teilnehmer des Workshops „Protease Kinetics“ im Rahmen des 8th General Meeting of the International Proteolysis Society am Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine at the University of Cape Town, Südafrika
seit 02/2010	Betreuung von Medizinstudierenden im Praktikum der Klinischen Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Medizinische Fakultät der LMU, München

Publikationen

Grundhuber M, Simon S, Fratila L, Teupser D, Sommerhoff CP. Generation of tools and assays to study human mast cell tryptases. Clin Chem Med Lab, 2014, 52(11): A141.

Münder S, Tischer S, **Grundhuber M**, Büchels N, Bruckmeier N, Eckert S, Seefeldt CA, Prexl A, Käsbauser T, Böttger A. Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in hydra. Dev Biol, 2013; 383(1): 146-57.

Radzey H, Rethmeier M, Klimpel D, **Grundhuber M**, Sommerhoff CP, Schaschke N. E-64c-hydrazide: a lead structure for the development of irreversible cathepsin C inhibitors. ChemMedChem, 2013; 8(8): 1314-21.

Quimbar P, Malik U, Sommerhoff CP, Kaas Q, Chan LY, Huang YH, **Grundhuber M**, Dunse K, Craik DJ, Anderson MA, Daly NL. High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. J Biol Chem, 2013; 288 (19): 13885-96.

Grundhuber M, Gabrijelcic-Geiger D, Simon S, Teupser D, Sommerhoff CP. Recombinant expression of human mast cell tryptases. Clin Chem Med Lab, 2012, 50(9): A255.

Auszeichnungen

10/2015	IPS Travel Award, 9th General Meeting of the International Protease Society, Penang, Malaysia, 04. - 08.10.2015
10/2013	IPS Travel Award, 8th General Meeting of the International Protease Society, Kapstadt, Südafrika, 20. - 24.10.2013

Vorträge und Posterpräsentationen

10/2015	Generation of Tools for the characterization of human mast cell tryptases. <i>Vortrag</i> , IPS 2015 Early Career Forum, Penang, Malaysia, 03. – 04.10.2015. Structural and functional characterization of human mast cell tryptases. <i>Poster</i> , 9th General Meeting of the International Proteolysis Society, Penang, Malaysia, 04. – 08.10.2015.
02/2015	Generation and characterization of antibodies and immunoassays directed against human mast cell tryptases. <i>Vortrag</i> , 32rd Winter School on proteinases and inhibitors, Tiers, Italien, 25.02. – 01.03.2015.
12/2014	Generation and characterization of antibodies directed against human mast cell tryptases. <i>Vortrag</i> , und Structural and functional characterization of human mast cell tryptases. <i>Poster</i> , EMBRN-COST International Mast Cell and Basophil Meeting, München, 11. – 12.12.2014.
09/2014	Generation of tools and assays to study human mast cell tryptases. <i>Poster</i> , 1. Deutscher Kongress der Laboratoriumsmedizin, Mannheim, 24. – 27.09.2014.
10/2013	Recombinant production and generation of tools against human mast cell tryptase γ . <i>Poster</i> , 8th General Meeting of the IPS, Kapstadt, Südafrika, 20. – 24.10.2013.
11/2012	Recombinant expression of human mast cell tryptases. <i>Poster</i> , EMBRN-COST International Mast Cell and Basophil Meeting, Berlin, 26. – 27.11.2012.
09/2012	Recombinant expression of human mast cell tryptases. <i>Poster</i> , 9. Jahrestagung der DGKL, Mannheim, 26. – 29.09.2012.
06/2012	Recombinant expression and characterization of human mast cell tryptase γ . <i>Poster</i> , Summer School on Mast Cell Biology of the DFG SPP 1394, Dresden, 13. – 15.06.2012.
03/2012	Functional characterization of human mast cell tryptase γ in comparison to tryptase β . <i>Vortrag</i> , 29th Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers, Italien, 29.02. – 04.03.2012.
10/2011	Recombinant expression of human mast cell tryptase γ . <i>Poster</i> , 7th General Meeting of the IPS, San Diego, USA, 16. – 20.11.2011.
03/2011	Recombinant expression of the zymogen and an engineered mature form of human mast cell tryptase γ . <i>Vortrag</i> , 28th Winter School on Proteinases and their Inhibitors, Tiers, Italien, 23. – 27.02.2011.
12/2010	Recombinant Expression of tryptase γ in <i>E. coli</i> and <i>P. pastoris</i> . <i>Poster</i> , EMBRN-COST International Mast Cell and Basophil Meeting, Berlin, 09. – 10.12.2010.
06/2010	Recombinant expression of human mast cell tryptase γ . <i>Vortrag</i> , Summer School on Mast Cell Biology of the DFG SPP 1394, Tübingen, 17.06. – 19.06.2010.

9.2 Aufstellung natürlich und nicht natürlich vorkommender Aminosäuren

